

Liste des abréviations :

5-FU : 5-fluoro-uracile

Abl : Proto-oncogène isolé d'Ableson murine Leukemia virus

APC: *Adenomatous Polyposis Coli*

ARI-1 : Aldehyde intermediate reductase 1

ATP : Adénosine tri-phosphate

B-CLL : Leucémie lymphoïde chronique à cellules B

BCR : Récepteur des lymphocytes B

BiAbs : Bispécifiques Antibodies : Anticorps Bispécifiques

BRAFis : Inhibiteurs de BRAF

BSA: Albumine de sérum bovin

CAR-T Cells : Chimeric Antigen Receptor Lymphocytes T cells

CBNP : Cancer bronchique non à petites cellules

CCK4 : Carcinome kinase 4 du côlon

CDK9 : Cycline dépendante de la kinase 9

CRC : Cancer colorectal

CRD : Domaines riches en Cystéine

CSC : Cellules Souches Cancéreuses

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques

CT : Chimiothérapie

CTNNB1: Catenin beta 1

DAPK1: Death-associated protein kinase 1

DEPC: Diethylpyrocarbonate

DLBCL : Lymphome Diffus à Grandes Cellules B

DMEM: Dulbecco's modified Eagle-Medium

DMSO: Dimethyl sulfoxide

dNTP: Desoxyribonucleotide triphosphate

DOTA: Tetraazacyclododecanetetraacetic acid = Odotreotide

Dsh: Disheveled

EDTA: Ethylenediaminetetraacétique

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

EMT: Transition Épithelio-Mésenchymateuse

ERK: Extracellular signal-regulated kinase

Fab: Fragment de liaison à l'antigène

FBS : Sérum de veau fœtal

Fc : Fragment cristallisable

FDA: Food and Drug Administration

FDG: Fluorodéoxyglucose

GSK-3: Glycogène synthase kinase 3

GSK3β: Glycogen synthase kinase 3 beta

GTP: Guanosine triphosphate

HER3/ERBB3: Human epidermal growth factor Receptor 3

HRP: Horseradish Peroxidase

mCRC: metastatic Colorectal Cancer

MQ: Eau distillée

LAL : Leucémie Aigüe Lymphoïde

LKB1 : Liver Kinase B1

LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique

mAb: Monoclonal Antibody

MAPK: Mitogen Activated Protein Kinases

MCL : Lymphome à Cellules du Manteau

MEK : MAPK/ERK Kinase signalisation pathway

MET : recepteur du facteur de croissance des hépatocytes

mTOR : Mechanistic Target Of Rapamycin

NRG1: Neurégulines

NSCLL : Non-Small Cells Lung cancer : cancer du poumon non à petites cellules

NTRKR1 : Tyrosine kinase neurotrophique liée au recepteur 1

PBS: Phosphate-Buffered-Saline

PCP: Polarité Cellulaire Planaire

PDX: Patients Derived Xenograft

TEP: Tomographie par Emission de Positrons

PI3K: Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase

PKA: Protéine kinase A

PTK7: Tyrosine-protein kinase like 7

qPCR: Quantitative Polymerization Chain Reaction

RAF: Rapidly Accelerated Fibrosarcoma

ROR1: Receptor tyrosine kinase like Orphan Receptor

ROS: Espèces Reactives de l'Oxygene

RPMI: Roswell Park Memorial **SiRNA**: Small interferent RNA **TBS**: Tris Buffer Saline

RTK : Récepteur Tyrosines Kinase

SLA : Sclérose Latérale Amyothrophique

SPECT: Single Photon Emission Computed Tomography

TATE : Octreotate

TCF/LEF: T-cell factor/ Lymphoid Enhancer Factor

TKI: Tyrosine kinase inhibitor

TNBC: Triple negatif Breast Cancer

TOC : Modified somatostatin analog Tyr3-octreotide

WIF: Wnt Inhibitory Factor

WNT: Wingless/Integrated

Liste des illustrations :

Figure 1 : Schéma d'une protéine kinase active

Figure 2 : Schéma d'une pseudo protéine kinase

Figure 3 : diagramme de la structure du domaine de l'EGFR et du processus d'activation par le ligand.

Figure 4 : Structure protéique de la famille des récepteurs du facteur de croissance épidermique (EGFR)

Figure 5 : Séquence d'alignement des membres de la famille de l'EGFR de l'Homme et la souris

Figure 6 : Activation du pseudo-récepteur tyrosine kinase HER3 par une neuréguline

Figure 7 : Inhibition de la signalisation HER3

Figure 8 : Structure de différents pseudo-récepteurs tyrosine kinase incluant ROR2

Figure 9 : Différentes cibles d'actions des thérapies anti-ROR1

Figure 10: Mode de liaison de WNT5a à ROR1 en conditions normales

Figure 11 : Mode de liaison du Cirtumzumab à ROR1 et blocage de la signalisation WNT5a

Figure 12 : Les lymphocytes T du patient sont réquisitionnés par leucaphérese

Figure 13 : La strictinine inhibe la phosphorylation d'AKT et la phosphorylation de GSK3- β en aval.

Figure 14: Représentation schématique du récepteur RYK et de ses ligands ainsi que d'autres récepteurs de liaisons Wnt.

Figure 15 : Diagramme indiquant la contribution des différents exons à la participation de la structure protéique de PTK7.

Figure 16 : Représentation schématique simplifiée des voies de signalisation Wnt/ β caténine (A) et Wnt/PCP (B) et rôle de PTK7 dans ces voies.

Figure 17 : Structure schématique de la β -caténine.

Figure 18 : Structure de l'ADC anti-PTK7.

Figure 19 : L'édition du génome CRISPR/Cas9 des cellules T de donneurs sains est utilisée pour générer des CAR-T allogéniques anti-PTK7 cellules.

Figure 20 : Principe de la technique Nano-BRET™.

Figure 21 : Représentation schématique de la procédure de Western-Blot ;

Figure 22 : Représentation schématique du test essai de rapporteur de la luciférase.

Figure 23 : Effet des différents composés sur la voie de signalisation WNT PAR Topflash.

Figure 24 : Effet des différents composés sur la voie de signalisation wnt par RT-qPCR.

Figure 25 : Impact des composés 20274, 20278 et 20262 sur la viabilité des cellules HCT116, SW480 *in vitro*.

Figure 26 : Tableau des IC50 des molécules testées en cytotoxicité.

Figure 27 : Les lysats cellulaires totaux ont été extraits des cellules HCT116 et SW480 pour examiner les niveaux d'expression de PTK7 et β -caténine par western blot.

Figure 28 : Organoïde digestif de patient.

Figure 29 : Schéma du concept de « théranostique ».

Figure 30 : Structure du FDG (à gauche) très similaire à celle du glucose (à droite).

Figure 31 : Structure du 68-Ga DOTA-TOC.

Figure 32 : Principe de la tomographie par émission de positrons (TEP).

Figure 33 : Structure du 177 Lu-DOTA-TATE .

Figure 34 : Structure d'un anticorps conventionnel (à gauche) par rapport à un anticorps à domaine unique (à droite).

Table des matières

CHAPITRE 1 : Introduction générale	23
I. Les kinases	23
II. Les pseudokinases	24
CHAPITRE 2 : Pseudokinases et intérêt pharmaceutique	26
I. HER3	26
A. Introduction :	26
B. Propriétés structurelles	27
C. Rôle dans les pathologies humaines	29
D. Approches thérapeutiques	29
E. Les anticorps anti-HER3 :	32
1. Patritumab – (AMG-888 ou U3-1287).....	32
2. Seribantumab - (MM-121) :	33
3. MM-111 :	33
4. Erlotinib :	33
II. ROR1	34
A. Introduction	34
B. Propriétés structurelles	35
C. Rôle dans les pathologies humaines	36
D. Approches thérapeutiques	37
1. KAN0441571C :	39
2. Inhibiteur ARI-1 :	40
3. Le cirtumzumab.....	41
4. 5F1-B10 : un anticorps monoclonal de seconde génération :	44
5. Anticorps bispécifiques (biAbs) et conjugués médicaments :	44
6. CAR-T Cells :	44
7. Strictinine	46
III. RYK	48
A. Introduction	48
B. Propriétés structurelles	48
C. Rôle dans les pathologies humaines	49
D. Approches thérapeutiques.....	51
1. Anticorps monoclonal IgG1k: RWD1	52
CHAPITRE 3 : Développement de petites molécules chimiques inhibitrices de la voie de signalisation WNT/B-caténine par ciblage de l'interaction PTK7/B-caténine dans les cancers colorectaux	53

I.	Préambule	53
II.	PTK7	54
A.	Introduction	54
B.	Contextes et objectifs	55
C.	Matériels et méthodes.....	63
1.	Culture cellulaire	63
2.	Test de cytotoxicité au bleu d'Alamar.....	63
3.	Western-Blot	64
4.	TopFlash.....	67
5.	RT-qPCR.....	69
D.	Résultats	71
1.	Identification d'inhibiteurs de PTK7/ β caténine ciblant la voie de signalisation Wnt dans les cellules CRC	72
2.	L'inhibition de l'interaction PTK7/ β caténine par de petites molécules module l'expression des gènes cibles de la signalisation WNT dans les cellules CRC.....	73
3.	L'inhibition de l'interaction PTK7/ β -caténine est cytotoxique pour les cellules de CCR.....	75
4.	Visualisation de l'expression protéique de PTK7 et β -caténine par des cellules traitées par les inhibiteurs 20262 et 20278.....	77
E.	Discussion et conclusion	78
	CHAPITRE 4 : Intérêt d'une théranostique ciblant les pseudo-récepteurs tyrosines kinases.	81
I.	Diagnostic en oncologie : contexte et besoins.....	81
II.	Notion de théranostique.....	82
III.	Tomographie par émission de positrons (TEP)	83
IV.	Radiothérapie interne vectorisée (RIV)	86
V.	Applications des techniques d'imagerie diagnostiques aux pseudo-récepteurs tyrosine kinase : cas de PTK7.....	87
A.	Problématique.....	87
B.	Littérature	88
C.	Perspectives	88
1.	Ciblage de PTK7	89
2.	Radiomarquage du SdAb.....	90
3.	Evaluation préclinique.....	91
VI.	Conclusion :	92
VII.	Bibliographie	94
VIII.	Résumé	101
IX.	Serment de Galien.....	102

CHAPITRE 1 : Introduction générale

I. Les kinases

Les kinases, protéines kinases ou phosphotransférases sont des protéines enzymatiques qui catalysent le transfert de groupement phosphates de hautes énergies, de groupement dit « donneurs » comme l'adénosine-5'-triphosphate (ATP) ou guanosine-5'-triphosphate (GTP) à des groupements moléculaires dit « accepteurs », contenant la plupart du temps, des molécules d'oxygène, d'azote ou de soufre¹.

Les protéines kinases sont des constituants essentiels pour toutes les voies de signalisations, elles régulent l'activité de protéines cibles grâce à leur pouvoir catalytique permettant donc la phosphorylation et l'initialisation de cascades de signalisations.

Ce processus de phosphorylation est le point de départ de diverses cascades moléculaires par modification de l'activité de protéines spécifiques. Les protéines kinases toutes confondues ou « kinome » peuvent représenter jusqu'à 4% du génome humain. De plus, on estime qu'environ un tiers des protéines de cellules animales présentent une phosphorylation sur au moins une position. Ces protéines sont donc nombreuses et leurs activités jouent un rôle important pour les processus physiologiques. Cependant, quand une dérégulation a lieu, la conséquence peut être grave et les pathologies associées sont multiples.

La structure d'une protéine kinase a été décrite pour la première fois par Knighton et al., 1991², décrivant l'architecture du site catalytique de l'enzyme protéine kinase A (PKA) et son mode de liaison au substrat.

Majoritairement les protéines kinases sont divisées en deux catégories :

- les tyrosines kinases, phosphorylant les résidus tyrosines de protéines
- les sérine/thréonine kinases, phosphorylant les résidus sérine/thréonine de protéines

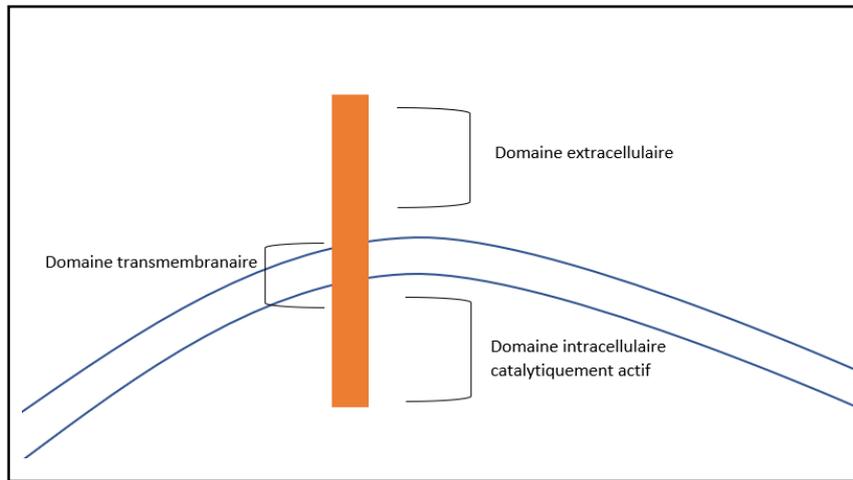


Figure 1 : Schéma d'une protéine kinase active

Les kinases sont devenues l'une des cibles les plus importantes dans la recherche pharmacologique actuelle, en particulier dans le cancer, en raison de leur rôle déterminant dans la signalisation cellulaire. La dérégulation de ces protéines kinases, comme Abl, CDK9 ou DAPK1, peut accélérer la progression de diverses maladies, c'est pourquoi les protéines kinases sont considérées comme des cibles attractives dans plusieurs pathologies et les drogues ciblant ces protéines sont largement étudiées. A ce jour, plus de 30 petites molécules inhibitrices de kinases ont été approuvées par la FDA³. Ces composés sont pour la plupart des inhibiteurs compétitifs réversibles de l'ATP et empêchent directement la phosphorylation de protéines et leur surexpression dans certaines maladies.

II. Les pseudokinases

Les pseudokinases font partie de la superfamille des protéines kinases et demeurent pour la plupart sans pouvoir catalytique car dépourvus d'un ou plusieurs acides aminés ou de motifs canoniques généralement nécessaires pour phosphoryler des protéines et engendrer une réponse cellulaire en réponse à un stimulus. On estime qu'environ 10% du kinome humain est constitué de pseudokinases⁴.

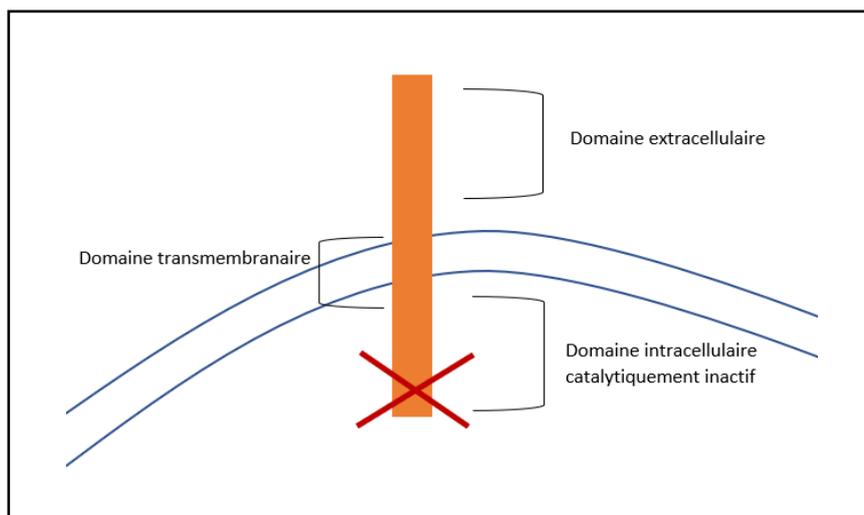


Figure 2 : Schéma d'une pseudo protéine kinase

Malgré l'absence de leur pouvoir de phosphorylation, il a été démontré qu'un certain nombre de pseudokinases sont impliquées dans de nombreuses pathologies, environ $2/3$ ^{5 6}. Depuis leur découverte, notre compréhension de leur structure et fonction n'a cessé d'évoluer. La dérégulation de leur fonction donne lieu à plusieurs pathologies comme le cancer mais aussi des maladies immunologiques, neurologiques et métaboliques. Du fait de leur fonction biologique incomplète, elles constituent un défi pour la recherche. Une multitude d'altérations génétiques dans les pseudokinases et des niveaux élevés d'expression de ces mutations sont à l'origine d'évènements moteurs dans la transformation maligne. Bien que ces mutations favorisent parfois la surexpression de gènes suppresseurs de tumeur tel que LKB1⁷, il n'en reste pas moins que dans la majorité des cas ce sont des domaines oncogènes qui sont hyperactivés dans le cancer³.

Si leur analogie structurelle et fonctionnelle avec les kinases permet de penser que des thérapies ciblées pourraient voir le jour, il est de ce fait légitime de penser que leur rôle est tout aussi important que celui de leurs homologues actifs. A ce jour, de nouvelles thérapies sont en développement.

Le but de cette thèse est de présenter l'intérêt du développement de nouvelles solutions thérapeutiques pour les pathologies humaines concernées par les pseudokinases tout en passant en revue leur caractéristiques, en établissant un lien avec les pathologies dont elles sont responsables et en présentant l'arsenal thérapeutique qui existe à ce jour. De plus, nous présenterons l'intérêt de leur ciblage en théranostique.

Pour cela, nous présenterons certaines pseudokinases choisies pour le défi qu'elles représentent au niveau thérapeutique puis nous nous attarderons sur 3 pseudokinases en particulier que nous développerons plus en détail. Enfin, je présenterai les données et résultats obtenus lors de mon stage de cinquième année de pharmacie portant sur le pseudo-récepteur tyrosine kinase 7 (PTK7), travail faisant partie intégrante de cette thèse.

CHAPITRE 2 : Pseudokinases et intérêt pharmaceutique

I. HER3

A. Introduction :

HER 3 ou Erb3 est un pseudo-récepteur tyrosine kinase qui fait partie d'un groupe de récepteurs du facteur de croissance épidermique humain (EGFR). La famille des récepteurs HER est composée de quatre récepteurs transmembranaires étroitement apparentés (EGFR/HER2/HER3/HER4) et constitue un réseau de signalisation complexe entrelacé avec différentes voies de signalisations telles que ras/raf/MAPk⁸. Ces molécules sont connues pour contrôler le cycle cellulaire et l'apoptose tumorale ; elles régulent la survie, la prolifération, l'angiogenèse mais aussi le métabolisme tumoral.

A l'inverse des autres membres de la famille des récepteurs à l'EGF qui possèdent des domaines tyrosines kinases actifs, HER3 manque d'activité kinase intrinsèque⁸, il s'agit donc d'une pseudokinase.

L'activation d'HER3 se fait par liaison d'un ligand au récepteur ou par hétérodimérisation avec d'autres membres de la famille HER. Son activation aberrante déclenche une série d'événements cellulaires conduisant à divers types de cancers, c'est pourquoi nous nous intéressons à son ciblage thérapeutique.

B. Propriétés structurelles

La famille de récepteur HER se compose d'un domaine extracellulaire glycosylé, d'une partie transmembranaire hydrophobe et d'un segment intracellulaire comprenant le domaine protéine kinase⁹. Le manque d'activité d'HER3 provient d'un défaut structural au sein du domaine kinase qui manque de différents résidus nécessaires à la catalyse. En effet, HER3 ne possède pas de domaine kinase actif.

Même si HER3 ne peut être correctement activé, son activité est connue et HER3 peut s'hétéro-dimériser avec d'autres membres de la famille de l'EGF et contribuer à leur activation⁸. L'analyse de la structure cristalline de HER3 permet de déterminer si le manque d'activité est lié à sa structure. L'activation des membres de la famille EGFR implique la formation de dimères asymétriques entre les domaines kinases intracellulaires dans lesquels un domaine kinase agit comme activateur allostérique de l'autre¹⁰. Les comparaisons de séquences entre HER3 et les autres membres de sa famille montrent que bien qu'elle ne puisse être activée, HER3 peut servir d'activateur dans les dimères asymétriques¹⁰.

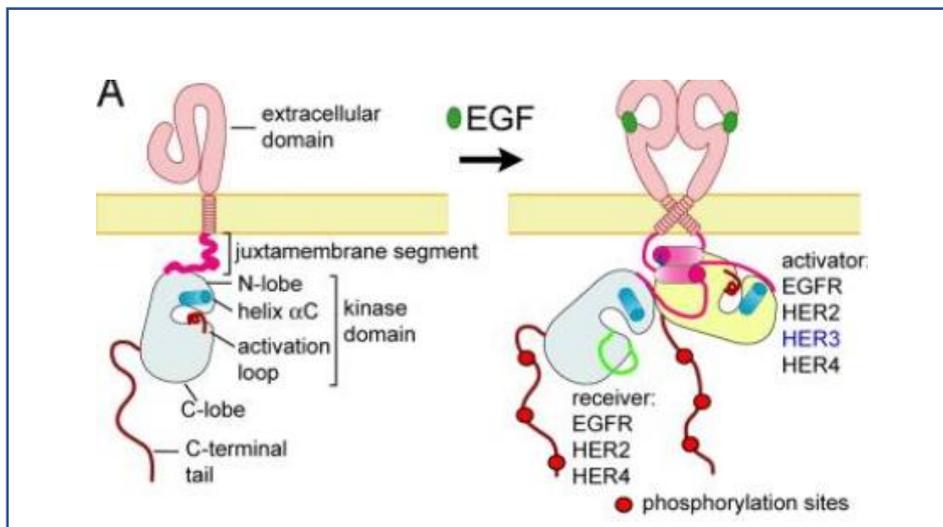


Figure 3 : Diagramme de la structure du domaine de l'EGFR et du processus d'activation par le ligand⁸.

L'étude menée par l'équipe de Zhang et al., en 2016,⁸ montre que la structure du domaine kinase de HER3 diffère peu d'un domaine d'une kinase active mais est verrouillée dans une conformation inactive. Le domaine kinase HER3 est incapable d'être une kinase fonctionnelle

réceptrice. De plus , une différence majeure de contrôle de leur activité est mise en évidence, les récepteurs HER1, HER2 et HER3 sont régulés par des mécanismes auto-inhibiteurs alors que cela n'est pas le cas pour HER4 qui est donc actif constamment¹⁰.

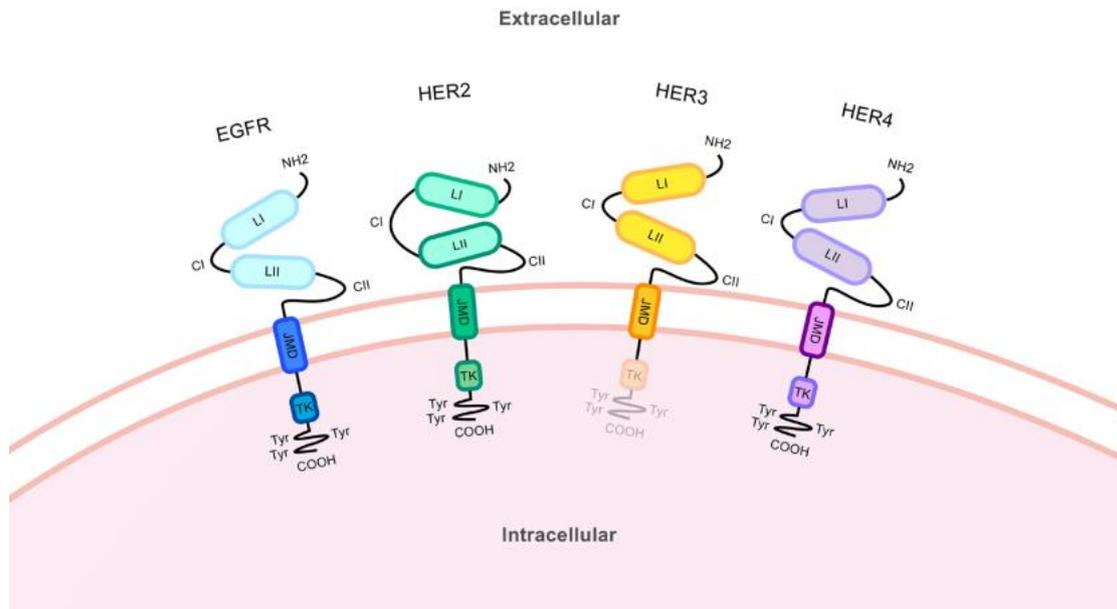


Figure 4 : Structure protéique de la famille des récepteurs du facteur de croissance épidermique (EGFR)^{11 12} .

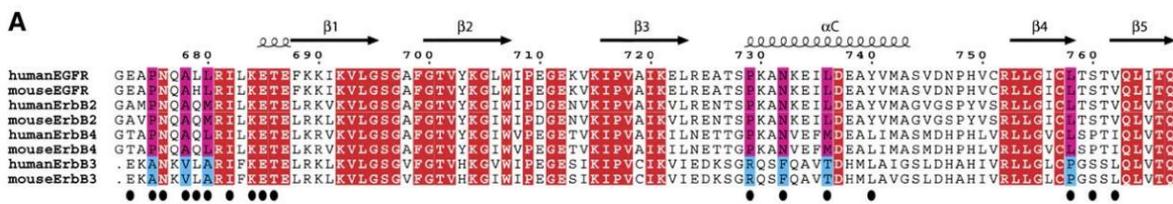


Figure 5 : Séquence d'alignement des membres de la famille de l'EGFR de l'Homme et la souris⁸.

C. Rôle dans les pathologies humaines

L'implication de HER3 dans la survenue de différents cancers est établie. Sa surexpression a été rapportée dans des cancers primaires mais aussi en culture cellulaire. La surexpression de HER3 touche le cancer du sein, de l'ovaire, du poumon, du pancréas, de l'estomac mais aussi de la cavité buccale. Les techniques d'immunohistochimie ont permis de mettre en évidence que dans 50 à 70% des cancers du sein, HER3 est surexprimé et dans la plupart des cas, ce pseudo-récepteur est co-surexprimé avec HER2. Dans le cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC), le cancer du sein et de celui de l'ovaire, l'expression de HER3 est associée à une survie globale plus courte^{13 14}.

D. Approches thérapeutiques

Les connaissances sur le pseudo-récepteur tyrosine kinase HER3 nous permettent de l'évaluer comme étant une cible à haut potentiel pour le développement de stratégies thérapeutiques inhibant son activité particulière. Il existe des traitements courants anti-HER3 utilisés mais la plupart du temps ne sont pas suffisants. Il existe aussi des molécules en développement clinique qui semblent prometteuses. Les thérapies anti-ERB ont une place incontournable et incontestée dans l'arsenal thérapeutique en cancérologie.

Schématiquement, l'activation de HER3 se fait par la liaison de facteurs de croissances appelés « neurégulines » ou « NRG1 » qui permettent un changement conformationnel menant à sa dimérisation avec d'autres récepteurs de la famille ERB.

NRG1 est un ligand direct de HER3 et HER4 et permet le recrutement de corécepteurs ERB et HER2 menant à la phosphorylation de la tyrosine et l'activation des récepteurs de la famille HER. Ce phénomène conduit à l'activation de chaque acteur de la dimérisation par l'autre partenaire aboutissant à la phosphorylation des récepteurs de l'activation des voies de signalisation majeures RAS/RAF/MEK/ERK et PI3K/AKT/mTOR.

Il a été démontré par une étude, que l'interaction de NRG1 avec HER3 permet une prolifération cellulaire autocrine ou paracrine dans les cellules cancéreuses du poumon et du côlon^{15 16}. De plus en plus d'études concernant NRG1 sont conduites et il a également été prouvé que son extinction inhibait l'activité de HER3 et par extension la prolifération cellulaire. Le contraire a

aussi été démontré, l'extinction de HER3 réduit le niveau de NRG1 et inhibe l'invasion de cellules tumorales¹⁷. L'intérêt dans le ciblage de HER3 par NRG1 paraît d'autant plus clair qu'une étude de Gostring et al., a démontré que la coopération NRG1/HER3 jouait un rôle important dans le processus de prolifération des cellules cancéreuses du sein surexprimant HER2¹⁸. Finalement, NRG1 est une bonne cible thérapeutique et l'utilisation d'anticorps neutralisants anti-NRG1 permettrait l'inhibition de l'ERBB, notamment dans le cancer de la prostate mortel où il a été démontré que HER3 était surexprimé et activé par des NRG1 eux-mêmes activées par des cellules inflammatoires.¹²

La chaîne d'activation de HER3 faisant évoluer plusieurs acteurs, les cibles thérapeutiques sont multiples pour empêcher l'activation des voies de signalisations oncogéniques.

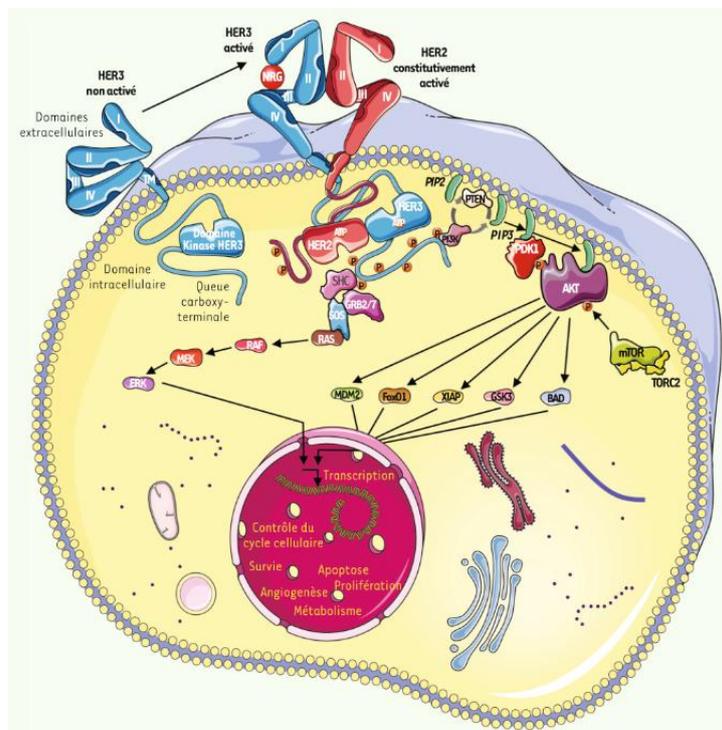


Figure 6: Activation du pseudo-récepteur tyrosine kinase HER3 par une neuréguline.

La faible activité kinase du récepteur HER3 rend compliqué le développement d'inhibiteurs de tyrosine kinase ciblant ce domaine en particulier. Cependant, la thérapie ciblée à base d'anticorps monoclonaux est une méthode de choix pour le développement de futures thérapies. Les différentes stratégies existantes sont le blocage du récepteur par des anticorps, le blocage de la signalisation (des dimères) HER3 par d'autres membres de la famille HER et le ciblage des ligands HER3.

Nous présentons les différentes méthodes de ciblage de la signalisation HER3 existantes :

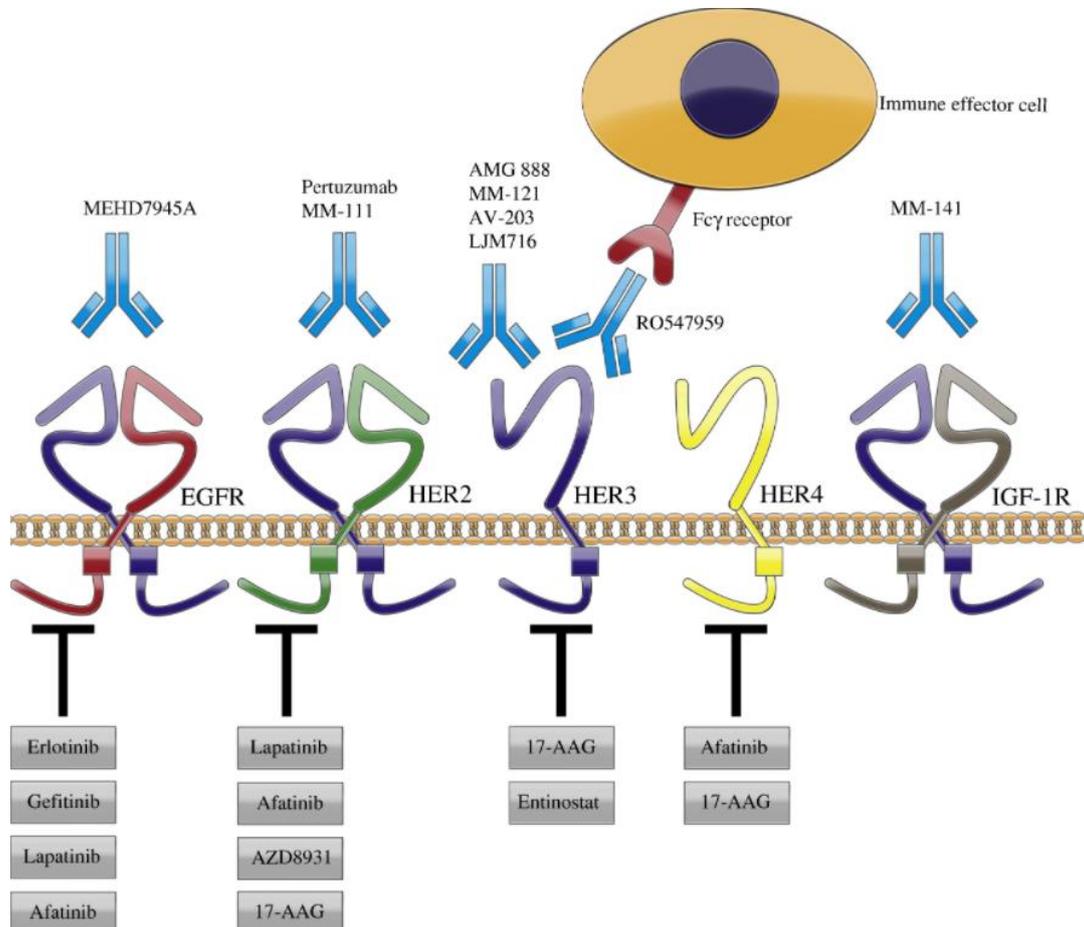


Figure 7: Inhibition de la signalisation HER3¹⁹.

Les anticorps tels que MM-121, AMG 888, AV-203 ou LJM716 ne ciblent que le récepteur HER3. RO547959 se distingue des autres anticorps car possède une région Fc glycosylée menant à une plus grande affinité pour HER3. Les composés MM-111, Pertuzumab, MEHD7945A inhibent la signalisation des dimères HER2/HER3 et EGFR/HER3. Le MM-141 est un anticorps bispécifique qui co-cible HER3 et IGF-1R. Les TKI (inhibiteurs de tyrosine kinase) Erlotinib et Gefitinib inhibent l'EGFR, la Lapatinib et l'AZD8931 inhibent l'EGFR et HER2 et l'Afatinib inhibe l'EGFR, HER2 et HER4 et donc pourraient inhiber indirectement HER3. L'Entinostat HDACi peut réduire les niveaux de HER2, HER3, p-AKT et p-MAPK. Enfin, l'inhibiteur HSP90 17-AAG inhibe la maturation conformationnelle et le repliement de

protéines de signalisations comme HER mais aussi les composés de la signalisation en aval et inhibe ainsi HER3.

E. Les anticorps anti-HER3 :

Nous allons nous attarder sur les mécanismes de ciblage les plus prometteurs qui sont les anticorps monoclonaux anti-HER3. La plupart des anticorps anti-HER3 ne reconnaissent que HER3 mais certains ont été conçus pour reconnaître également un récepteur tyrosine kinase (RTK) supplémentaire. La plupart des médicaments sont actuellement en phase d'essais cliniques et nous en développons 4 d'entre eux :

1. Patritumab – (AMG-888 ou U3-1287).

Il s'agit d'un anticorps entièrement humanisé qui a démontré son efficacité *in vitro* et *in vivo* dans des modèles de xénogreffes. Il inhibe la fixation du ligand sur HER3 et donc empêche la phosphorylation induite du récepteur. Il en résulte une down-régulation de HER3 avec une suppression de la prolifération, de la survie et de la croissance des cellules cancéreuses associées⁹. *In vitro*, cet anticorps se lie au domaine extracellulaire de HER3 et facilite l'internalisation du récepteur inhibant toute signalisation induite par le ligand²⁰. Cet anticorps est actuellement testé en phase III dans le traitement de cancers du poumon non à petites cellules métastatique notamment.

Une synergie d'action avec l'EGFR-TKI Erlotinib a été observée dans le modèle de xénogreffe FaDu²¹ par rapport à son utilisation seul.

En se basant sur la capacité de HER3 à se dimériser avec d'autres membres de la famille HER, une thérapie combinée avec d'autres molécules anti-HER pourrait être efficace dans le traitement de diverses tumeurs malignes.

2. Seribantumab - (MM-121) :

Il s'agit d'un anticorps monoclonal qui est utilisé pour bloquer l'heterodimerisation de HER3 avec d'autres membres de la famille HER. Cet anticorps inhibe la croissance cellulaire modulée par la neuréguline NRG1 dans des cancers comme le sein et le poumon. En clair, il inhibe la tumorigenèse dépendante de NRG1²².

Cet anticorps est un des plus étudiés actuellement, notamment en combinaison avec différentes thérapies comme les TKI (Erlotinib) ou chimiothérapies (paclitaxel) pour le traitement de différents types de cancers et il fait l'objet de plusieurs phases 2 d'essais cliniques⁸.

3. MM-111 :

Il s'agit d'un anticorps bispécifique, c'est à qu'il se lie spécifiquement à HER2 et HER3 et forme un complexe de trimère. Il sert notamment à inhiber spécifiquement la signalisation HER3 dans les cancers où HER2 est surexprimé représentant un sous-type largement représenté dans les cancers du sein et les cancers gastriques⁸. Il est également envisagé d'évaluer MM-111 en combinaison avec d'autres thérapies ciblant HER2 comme le Trastuzumab ou le Lapatinib. Actuellement, MM-111 est testé dans deux phases cliniques 1.

4. Erlotinib :

L'Erlotinib ou [6,7-bis(2-methoxy-ethoxy)-quinalzolin-4-y]-[3-ethylphenyl]amine) est une petite molécule inhibitrice de tyrosine kinase et cible l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) . Elle inhibe l'autophosphorylation de l'EGFR en se liant compétitivement à l'ATP (Adénosine Triphosphate) par liaison à un domaine intracellulaire de la tyrosine kinase.

II. ROR1

“The ROR1 pathway holds great promise in terms of generating a new wave of first-in-class, targeted cancer therapies for patients with a number of cancers, including leukemia, lymphoma, and solid tumors such as ovarian and breast cancers.”

Dr. Thomas J. Kipps, University of California San Diego

A. Introduction

Le récepteur transmembranaire tyrosine kinase ROR1 aussi connu sous le nom de tyrosine kinase neurotrophique liée au récepteur 1 (NTRKR1) est une enzyme codée chez l’homme par le gène ROR1. ROR1 est un membre de la famille des récepteurs orphelins de type tyrosine kinase (ROR), nommé « orphelin » car à l’ époque de leur découverte, leur ligand naturel n’est pas encore connu.

Ils sont apparentés aux familles de récepteurs Trk-RTK : kinases spécifiques du muscle (MuSK) et neurotrophique tyrosine Kinase (NTRTK)²³. En effet, les gènes codant pour ROR1 ont été identifiés pour la première fois dans une lignée cellulaire de neuroblastome. Il est situé sur le chromosome 1 et code pour une protéine de 104 kDa²⁴.

Tout comme deux autres des pseudokinases que nous allons présenter, ROR1 est impliqué dans la voie de signalisation Wnt jouent le rôle de récepteur de Wnt 5a, pour médier la signalisation WNT non canonique par la voie de signalisation polarité planaire (PCP). Il est largement exprimé lors du développement embryonnaire mais aussi dans de multiples cancers.

ROR1 n’est pas exprimé dans la plupart des tissus adultes normaux, cependant son expression via une régulation transcriptionnelle à la hausse est associée à divers types de cancers. Il a été démontré que ces récepteurs jouent un rôle important au niveau de la migration et de l’invasion cellulaire dans le cadre de développement tumoraux.

B. Propriétés structurelles

Globalement, les récepteurs orphelins de type tyrosine kinase sont des protéines membranaires composées de trois domaines extracellulaires dont un domaine Immunoglobuline, un domaine Frizzled riche en cystéine et un domaine Kringle, puis un domaine transmembranaire et un domaine tyrosine kinase intracellulaire.

Des études génomiques ont démontré que les domaines extracellulaires et le domaine intracellulaire sont conservés depuis la drosophile, en passant par *Caenorhabditis elegans* (nématode de la famille des Rhabditidae) jusqu'aux souris et humains.

ROR1 existe sous 2 variants d'épissages différents qui sont :

-v1 : t-ROR1 = ROR1 tronqué, ce variant est dépourvue de tous les domaines extracellulaires

-v2 : ce variant est dépourvue du domaine intracellulaire et du domaine transmembranaire.

Certaines études concernant les propriétés structurelles des RORs concluent à un manque d'activité biologique quant au domaine kinase inactif, tandis que d'autres suggèrent un rôle essentiel dans la transduction du signal vers les protéines en aval.

Pour ROR2 cependant, l'activité kinase est bien établie.

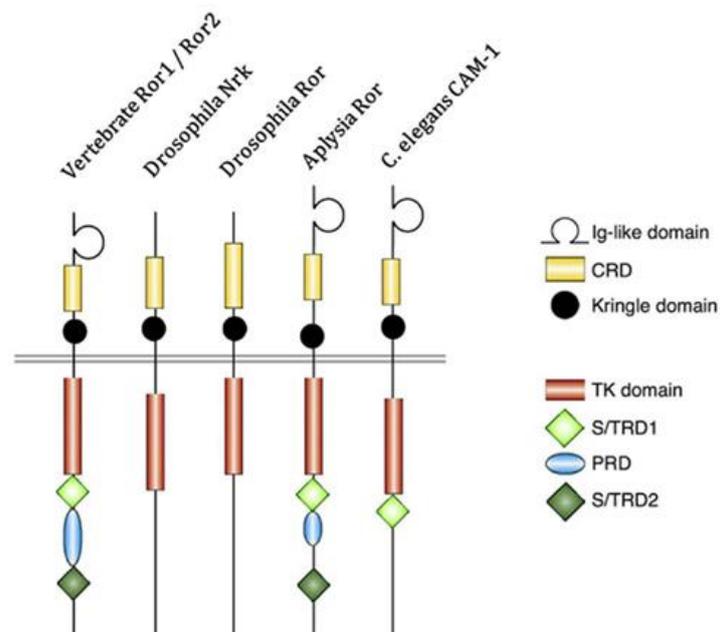


Figure 8 : Structure de différents pseudo-récepteurs tyrosine kinase incluant ROR2

C. Rôle dans les pathologies humaines

Le domaine kinase intracellulaire de ROR1 contient des substitutions d'acides aminés dans des positions connues pour être critiques pour la fonction enzymatique de la tyrosine kinase, c'est pourquoi, elle fait partie de la famille des pseudokinases.

Initialement, l'expression de la protéine ROR1 a été évaluée par analyse transcriptionnelle de tissus sains en comparaison à des tissus provenant d'échantillons de biopsies tumorales. Grâce à la technique de puces à ADN, qui est une révolution méthodologique permettant d'étudier le génome et d'identifier des réarrangements génétiques de petites tailles non décelés par des techniques classiques, une comparaison d'expression de gènes entre une leucémie lymphoïde chronique à cellules B (B-CLL) et des cellules B matures a tout d'abord permis d'identifier ROR1 comme un marqueur dans la B-CLL.

Puis petit à petit, il s'est avéré que ROR1 est exprimé dans plusieurs types de cancers grâce à une analyse de l'ARN dans les tissus. L'expression de ROR1 a également été analysée dans plusieurs tissus normaux par transcription, Western-Blot et immunohistochimie. Cependant, les ADNc complémentaires obtenus ont permis de souligner une proportion augmentée de l'ADNc de ROR1 dans des tissus comme le tissu adipeux et le pancréas par rapport à d'autres tissus normaux. Globalement, ces études montrent que les résultats de présence de ROR1 sont variables mais que le variant 1 (v1) de ROR1 est exprimé sélectivement sur les cellules tumorales et non pas dans les tissus normaux²⁵. Cette analyse montrant une expression sélective de ROR1 permet de faire de ROR1 une cible intéressante pour le développement de thérapies. De plus, ce ciblage est attrayant car il a été démontré que son expression améliore la croissance cellulaire tumorale et la survie de ces cellules et favorise la transition épithélio-mésenchymateuse et les métastases.

Plusieurs études ont montré que ROR1 est surexprimé dans de nombreuses tumeurs solides telles que le cancer du sein, de l'ovaire, du poumon²⁵. De plus, son expression serait importante dans le cadre du lymphome à cellules du manteau (MCL) et un sous ensemble de LAL à cellules B. Plus exactement, on observe souvent une surexpression de ROR1 dans les hémopathies malignes y compris dans la leucémie lymphoïde chronique. Une régulation à la hausse de ce

récepteur est également observée dans les cancers surexprimant le récepteur du facteur de croissance des hépatocytes comme le carcinome gastrique par exemple ⁵.

L'expression de ROR1 dans les tissus est un enjeu majeur, il est indispensable de connaître les tissus sains dans lesquels cette protéine est potentiellement exprimée pour évaluer la toxicité possible au niveau des tissus sains et pouvoir déterminer une balance bénéfice/risques pour les patients pouvant bénéficier d'une thérapie ciblée par anticorps monoclonaux anti-ROR1 par exemple. C'est pourquoi de nombreuses études portent sur l'évaluation de l'expression de ce récepteur dans les tissus normaux chez l'Homme.

Pour éviter les risques de rechutes par manque d'expression de la cible au niveau de cellules cancéreuses et afin de déterminer la toxicité de nouvelles molécules pour certains organes, une étude a permis de démontrer le taux d'expression de ROR1 dans les tissus normaux humain par la création d'un anticorps monoclonal murin (mAb) spécifique d'un peptide présent à l'extrémité terminale carboxyle de ROR1 et qui peut être utilisé en immunohistochimie pour la caractérisation de l'expression de ROR1 à la surface cellulaire de tumeurs épithéliales ou de tissus sains. Les résultats de cette étude montrent que l'anticorps en question, le mAb 6D4, détecte spécifiquement ROR1 à la surface des cellules exprimés de manière endogène sur les tumeurs primaires avec une plus grande sensibilité que tout autre réactif ayant été utilisé auparavant et sans réactivité croisée avec ROR2.

D. Approches thérapeutiques

Comme dit précédemment, la prise en compte de l'expression des pseudo récepteurs ROR1/ROR2 est nécessaire pour le ciblage et le développement de molécules afin qu'un traitement n'altère pas les tissus sains. Les différentes approches thérapeutiques présentées, se sont à priori affranchis de ces paramètres de toxicité pour les tissus sains.

Le récepteur ROR1 est exprimé dans le cas de certaines tumeurs hématologiques malignes telles que la leucémie lymphoïde aigue, la leucémie lymphocytaire chronique, le lymphome diffus a grandes cellules B, le lymphome folliculaire, le lymphome a cellules du manteau, le lymphome marginal. De plus, il est également retrouvé dans certaines tumeurs solides comme : les cancers du sein, du col de l'utérus, colorectal, de l'endomètre, de l'estomac, les cancers du poumon, les mélanomes et autres...

L'inhibition de la signalisation ROR1 peut avoir une activité thérapeutique chez les patients atteints de cancer. Il a été montré que l'inhibition ou le silence de ROR1 dans le cancer du sein a supprimé la transition épithéliale mésenchymateuse (EMT) et réprimé la migration et les métastases cancéreuses²⁶.

L'inhibition de ROR1 a inhibé le maintien des cellules souches cancéreuses (CSC) dans les xénogreffes dérivées de patientes atteintes de cancer de l'ovaire (PDX) et a altéré l'auto-renouvellement du CSC, comme en témoigne la capacité réduite des PDX à regreffer des souris immunodéficientes²⁷. De plus, le knockdown de ROR1 dans le glioblastome a supprimé l'expression des gènes liés à l'EMT, inhibé les métastases et induit la différenciation/sénescence des CSC²⁸.

De plus, nous savons que leur expression dans les tissus sains est importante puis régulée à la baisse après la naissance. De ce fait, le rôle unique des récepteurs ROR exprimés principalement dans les tissus cancéreux en fait de très bons candidats pour un ciblage thérapeutique.

Différentes approches sont en place pour cibler ROR1 et certains essais cliniques sont en cours.

Il existe plusieurs molécules en développement permettant une thérapie ciblée :

- L'agent KAN0441571C qui joue le rôle de d'inhibiteur de tyrosine kinase et qui en ce moment est en phase d'essais cliniques²⁹.
- L'inhibiteur ARI-1 qui se lie au CRD de ROR1 et qui en ce moment est en développement préclinique.
- Un anticorps monoclonal (mAb) ciblant aussi le CRD de ROR1 : le cirmutuzumab, qui est en ce moment l'mAb le plus avancé dans le développement contre ROR1.

D'autres approches sont pensées comme le développement d'anticorps conjugués médicament comme l'anticorps VLS-101 liant le cirmutuzumab au MMAE et ciblant le CRD de ROR1.

Le développement d'anticorps bispécifiques est aussi proposé : ROR1 x CD3 ou le NBE-002²⁹. Ce sont des molécules qui combinent une région constante Fc et un fragment Fab de liaison à l'antigène dérivé de deux mAbs différentes.

Enfin, ROR1 est une bonne cible pour les cellules T chimériques modifiées par des récepteurs d'antigènes (Car-T cells). Ces cellules ciblent également le CRD de ROR1.

Finalement, la strictinine qui est un tanin d'origine végétal découvert récemment interagirait avec ROR1 et inhibe l'activité PI3K/AKT/GSK-3²⁹.

Nous allons dans la partie suivante développer ces différentes stratégies thérapeutiques.

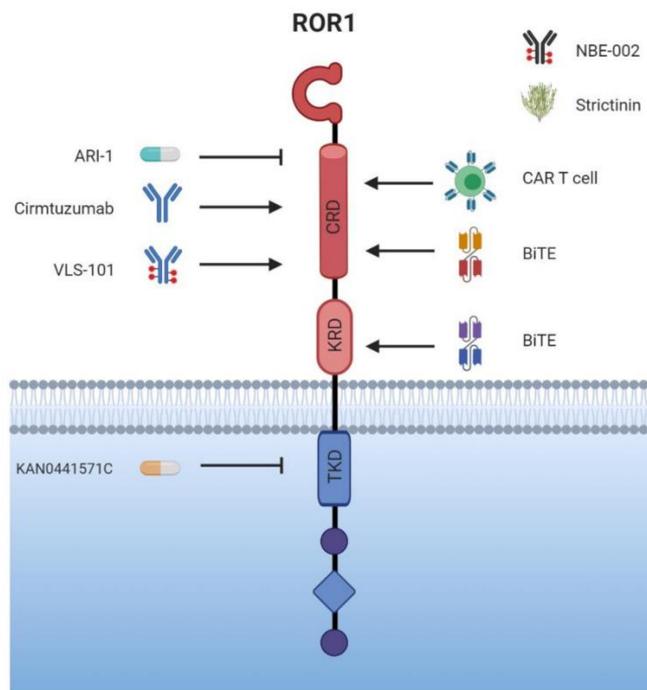


Figure 9 : Différentes cibles d'actions des thérapies anti-ROR1

1. KAN0441571C :

Le cas du lymphome diffus à grandes cellules B :

L'aspect inhibiteur de ROR1 de cette molécule est étudié entre autres dans le cadre du lymphome diffus à grandes cellules B (DLBCL)³⁰.

Le DLBCL est le lymphome non hodgkinien le plus fréquent. Il s'agit d'un cancer lymphatique caractérisé par une prolifération anormale des lymphocytes B eux-mêmes responsable de la production d'anticorps dans le corps humain. Après son installation ce cancer peut envahir différents compartiments de notre organisme comme le système lymphatique et tous les organes ou les lymphocytes B sont susceptibles de circuler. Les thérapies utilisées à ce jour consistent en une polychimiothérapie associant quatre principes actifs différents combiné à une

immunothérapie reposant sur un anticorps reconnaissant la protéine CD20 présente à la surface des lymphocytes B : le rituximab. Malheureusement aujourd'hui cette thérapie n'est pas suffisante et est inefficace chez environ 40% des patients pris en charge sans que l'on ne connaisse vraiment la raison.

La molécule KAN0441571C est le résultat d'une seconde génération d'inhibiteurs du domaine tyrosine kinase de ROR1. En effet, une première molécule a été synthétisée et décrite, il s'agit de la molécule KAN0439834. Avec elle, plus de 2000 composés ont été synthétisés par suite d'un criblage haut débit ciblant le domaine kinase de ROR1. Depuis sa découverte, environ 950 composés en plus ont été développés par comparaison de l'efficacité et de la toxicité avec cette dernière.

C'est à ce moment que l'inhibiteur de seconde génération a été découvert : KAN0441571C.

C'est une version améliorée de la 1^{ère} génération du fait de sa puissance cytotoxique plus élevée contre diverses cellules cancéreuses incluant : le lymphome hodgkinien, la LLC, le carcinome pancréatique et les cellules du cancer du poumon. De plus, sa demi-vie est sensiblement plus longue chez la souris par rapport à la première génération d'inhibiteur.

Il est apparu dans une étude qui a testé cette molécule sur différentes lignées cellulaires cancéreuses, notamment sur le DLBCL, que celle-ci induit un effet cytotoxique dose-dépendant dans toutes les lignées cellulaires exprimant ROR1 en comparaison à des lignées cellulaires dépourvus de ROR1 où aucun effet n'a été observé. Cela montre la spécificité de la molécule pour sa cible.

Les mécanismes qui permettent à cette molécule d'inhiber la protéines ROR1 restent cependant encore mal connus.

2. Inhibiteur ARI-1 :

Utilisation dans le cas du cancer de poumon non à petites cellules (CPNPC) :

L'une des principales causes de décès au monde est le cancer du poumon non à petites cellules (NSCLB) du fait de la résistance du cancer aux traitements et du manque de thérapie efficace disponible.

Le cancer du poumon se développe à partir de cellules situées dans le poumon et qui se sont multipliées de manière anormale pour former une masse ou une tumeur.

Le facteur de risque le plus important du développement du cancer du poumon est la cigarette.

De nombreux traitements sont déjà disponibles tels que la chirurgie, la chimiothérapie, des thérapies ciblées, de l'immunothérapie, de la radiothérapie. Ces traitements sont la plupart du temps utilisés en associations selon le stade de la maladie.

Ce cancer se place à la troisième place des cancers les plus fréquents en Europe et représente 85 à 90 % de l'ensemble des cancers du poumon et c'est pour cette raison qu'il est urgent de développer de nouveaux traitements contre ce CPNPC.

Le récepteur ROR1 est surexprimé de manière exceptionnelle mais non rare dans le cancer des poumons non à petites cellules et participe à son développement, notamment en participant à la résistance à certains médicaments. Il est donc évident que ROR1 soit une cible potentiellement importante pour le développement d'une nouvelle thérapeutique dans le cas du CPNPC.

ARI-1 est une molécule ciblant spécifiquement la domaine extracellulaire de ROR1 et supprime la prolifération et la migration des cellules CPNPC en régulant une voie de signalisation de manière dépendante de ROR1³¹.

3. Le cirtumzumab

Utilisation dans le cas de leucémie lymphoïde chronique (LLC) :

La leucémie lymphoïde chronique est une hémopathie maligne bien caractérisée. En effet, elle se décrit par un excès de lymphocytes B dans le sang, la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques et la rate.

La LLC représente un peu plus de 30% de l'ensemble des leucémies, ce qui en fait une cible thérapeutique importante.

La prise en charge la plus courante pour les patients présentant une forme stable de la maladie, consiste en une surveillance régulière. Cependant, dans les cas les plus avancés la chimiothérapie anticancéreuse est prescrite, les molécules utilisées sont les analogues de

purines comme le fludarabine ou des agents alkylants comme le bendamustine, le cyclophosphamide ou le chlorambucil. Une greffe de cellules souches peut être proposée dans les cas les plus graves.

Le cirtumzumab est un anticorps monoclonal humanisé de première classe avec une affinité élevée pour un épitope du récepteur ROR1. Cet anticorps se lie au domaine extracellulaire de ROR1 avec une spécificité et une affinité élevée pour celui-ci. Il fonctionne comme un inhibiteur compétitif de la liaison du ligand WNT à ROR1. En inhibant l'interaction, il empêche le déclenchement de la cascade de signalisation menant aux effets tumorigènes de ROR1. En effet, lorsque le cirtumzumab se lie à ROR1, il s'ensuit un blocage de WNT5a, ligand dans la voie de signalisation WNT, et induit la différenciation des cellules de la tumeur et inhibe la prolifération, la migration et la survie des cellules tumorales. Cependant, son action n'est pas observée seule mais en association avec l'Ibrutinib car une synergie d'action de ces deux molécules est démontrée dans le cas de plusieurs cancers.

La LLC a pour acteur la signalisation du récepteur BCR qui joue un rôle important dans la pathologie.

Un inhibiteur de la tyrosine kinase de Bruton (BTK) bloque la BCR, il s'agit de l'ibrutinib. Cependant, son action seule induit des réponses et des remissions incomplètes, ce qui suggère qu'une autre voie de signalisation est impliquée dans la croissance et la survie des cellules cancéreuses de la LLC, indépendamment de la signalisation BCR. En effet, cela s'explique par l'activation d'une autre protéine appelée Rac. Il se trouve que ROR1 est un récepteur WNT5a pouvant favoriser l'activation de Rac ayant pour finalité la prolifération et la survie des cellules de la LLC. Il a donc été démontré que le cirtumzumab pouvait bloquer l'activation de Rac1 induite par WNT5a en se liant à ROR1. C'est pourquoi l'association ibrutinib et cirtumzumab semble être une bonne association thérapeutique pour le traitement du LLC et d'autres tumeurs malignes à cellules B ROR1+.

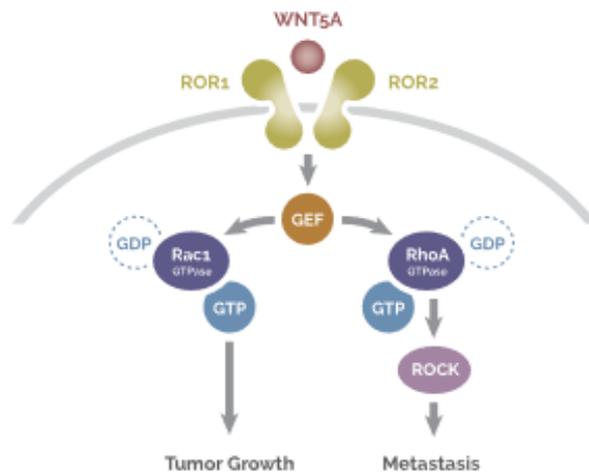


Figure 10: En condition normale, WNT5a se lie à ROR1, initiant la voie de prolifération associée au développement de la tumeur et des métastases.

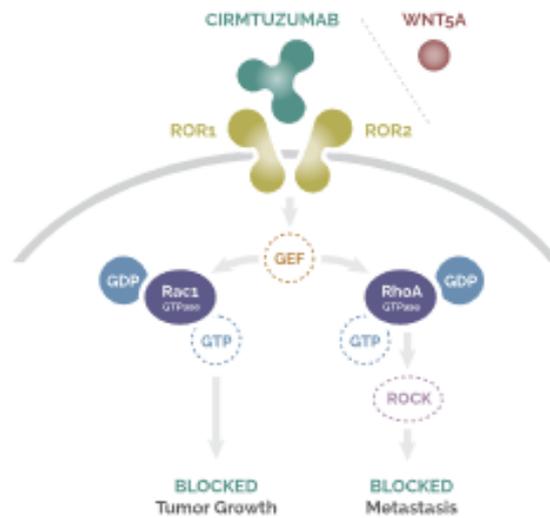


Figure 11 : Le cirmtuzumab se lie à ROR1, en bloquant la signalisation de WNT5a, inhibant le développement de la tumeur et des métastases.

4. 5F1-B10 : un anticorps monoclonal de seconde génération :

Utilisation dans le cas du cancer de la vessie :

Il s'agit d'un anticorps monoclonal (mAb) anti-ROR1 murin. Son potentiel a été évalué dans le cas du cancer de la vessie. Après avoir démontré que ROR1 était présent à un niveau significatif à la surface des cellules cancéreuses de la vessie, cet anticorps a été développé pour cibler ROR1 et induire l'apoptose en inhibant la signalisation pro-survie induite par ROR1. Cet anticorps est cependant délaissé au profit du cirtumzumab car son développement est plus avancé dans les études cliniques.

5. Anticorps bispécifiques (biAbs) et conjugués médicaments :

Parmi les autres options thérapeutiques en développement, il existe des méthodes basées sur l'activation de la réponse immunitaire humorale. Les anticorps bispécifiques sont des molécules construites par combinaisons de plusieurs régions d'anticorps spécifiques. Une région constante Fc et un fragment Fab qui se liera à l'antigène.

6. CAR-T Cells :

Utilisation dans le cas du cancer du sein :

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme et représente la première cause de mortalité par cancer chez la femme . Il résulte d'une production anarchique de cellules donnant une masse appelée tumeur. Il existe différents types qui n'évoluent pas de la même manière. Certains sont agressifs et évoluent très rapidement tandis que d'autres sont lent et évoluent sur plusieurs années.

Il existe différents traitements proposés mais comme pour les autres pathologies évoquées. La chirurgie, la radiothérapie, l'hormonothérapie, la chimiothérapie et les thérapies ciblées sont les

traitements utilisés aujourd'hui. Les thérapies ciblées sont un champ de développement pour les nouvelles molécules et plusieurs thérapies sont utilisées pour traiter ce cancer comme le trastuzumab, le bévacizumab, le lapatinib et l'évérolimus.

Cependant, il n'existe pas de traitement suffisamment efficace pour tous les types de cancer du sein à ce jour.

Les CAR-T cells (chimeric Antigen Receptor T cells) sont des récepteurs d'antigènes chimériques associées à des lymphocytes T. Le principe de cette immunothérapie consiste en une modification génétique des lymphocytes T d'un patient, afin qu'ils expriment à la surface une protéine chimérique spécifique. Ce récepteur permet ensuite aux lymphocytes de reconnaître des cellules cancéreuses spécifiques et de s'activer pour les détruire. Une fois ces cellules modifiées, elles sont réinjectées au patient.

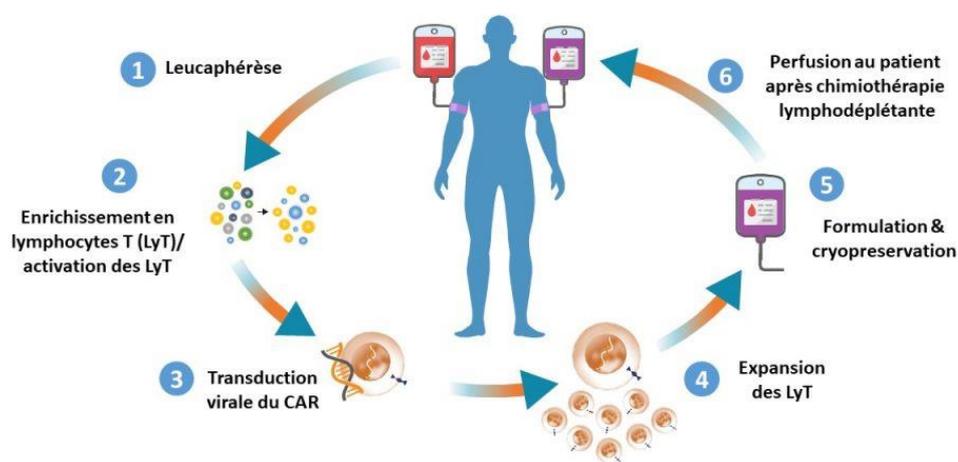


Figure 12 : Les lymphocytes T du patient sont réquisitionnés par leucaphérèse

Une étude en particulier, menée par Wallstabe et al.³², a permis de mettre en évidence l'efficacité *in vitro* de CAR-T cells sur des modèles tumoraux 3D du cancer du sein et du poumon.

Le traitement de modèles en trois dimensions de cellules du cancer du sein a été traité avec des CAR-T Cells anti ROR1 et a montré de puissants effets antitumoraux. Un effet antitumoral

spécifique et puissant a été observé dans les cultures 3D et il a été démontré que cet effet est dose-dépendant. De plus, cette étude montre que les cellules CAR-T ROR1 gardent leur potentiel antitumoral pendant plusieurs jours en culture 3D.

7. Strictinine

Utilisation dans le cancer du sein triple négatif (TNBC) :

En effet, alors que la plupart des thérapies ciblent les récepteurs hormonaux (hormonothérapie), il est impossible d'utiliser une telle thérapie dans le cas du cancer du sein triple négatif car il ne possède pas ces récepteurs. D'autres méthodes doivent être développées pour ce cancer qui est un des plus agressifs et pour lequel le taux de survie est loin derrière les autres sous-types de cancer du sein. Le cancer du sein triple négatif est donc une cible importante pour le développement de nouvelles molécules et présente un grand intérêt pour la recherche.

La strictinine est une molécule découverte récemment dans une banque de phyto-molécules ayant une action anticancéreuse pouvant cibler sélectivement le cancer du sein triple négatif. Après une étude menée par Fultang et al³³, la strictinine a montré des effets anti-TNBC en inhibant la voie de signalisation Akt/GSK3 β menant à l'inhibition de la production de ROR1.

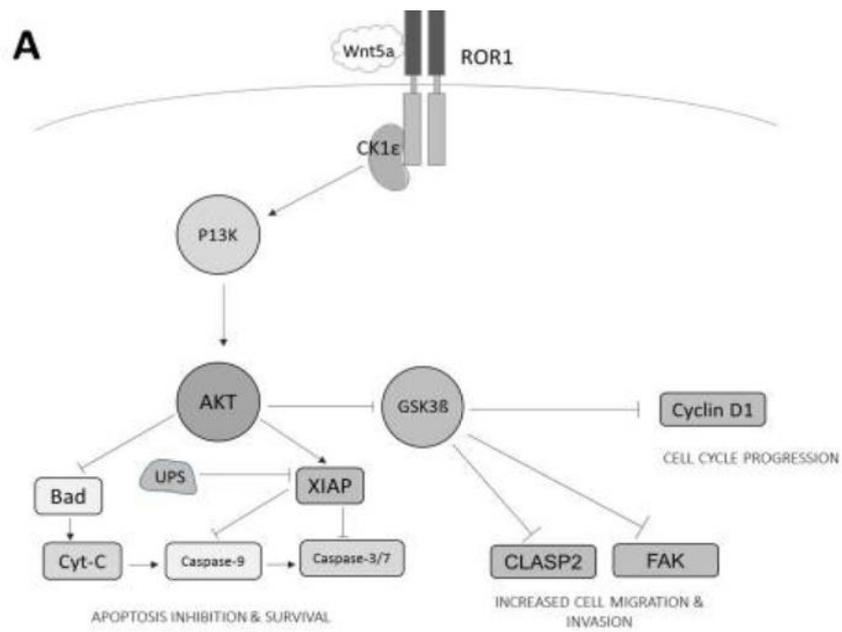


Figure 13 : La strictinine inhibe la phosphorylation d'AKT et la phosphorylation de GSK3- β en aval. De plus, la strictinine induit l'apoptose et diminue la survie cellulaire des cellules du TNBC tout en réprimant la motilité cellulaire cancéreuse.

Il s'agit d'une molécule prometteuse pour le traitement du TNBC par ciblage de la pseudokinase ROR1.

III. RYK

A. Introduction

Tout comme ROR1 présenté précédemment, RYK est un pseudo récepteur tyrosine kinase de liaison WNT. Ce pseudo-récepteur tyrosine kinase présente un manque d'activité apparent malgré sa fonction de signalisation, essentielle dans la voie de signalisation Wnt. Cependant, le domaine extracellulaire de RYK « WIF » a une grande affinité avec les ligands Wnt, ce qui implique RYK dans la régulation de processus biologiques fondamentaux, dans la migration cellulaire et notamment la croissance axonale.

B. Propriétés structurelles

Globalement, RYK se compose d'un domaine inhibiteur de WNT (WIF), une hélice transmembranaire suivie d'une région juxta membranaire intracellulaire riche en sérine et thréonine. Ce qui différencie principalement RYK des autres RTK est son domaine intracellulaire pseudokinase qui présente des résidus acides aminés atypiques sur certains sites considérés critiques pour l'activité kinase³⁴.

Il est probable que les substitutions d'acides aminés dans les boucles rigides en glycine des sous-domaines I et II de RYK soient à l'origine de l'inactivité de la kinase, empêchant ainsi son autophosphorylation ou sa phosphorylation avec d'autres kinases³⁴.

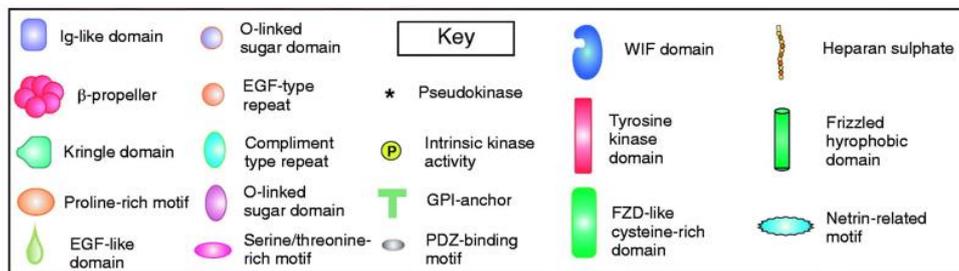
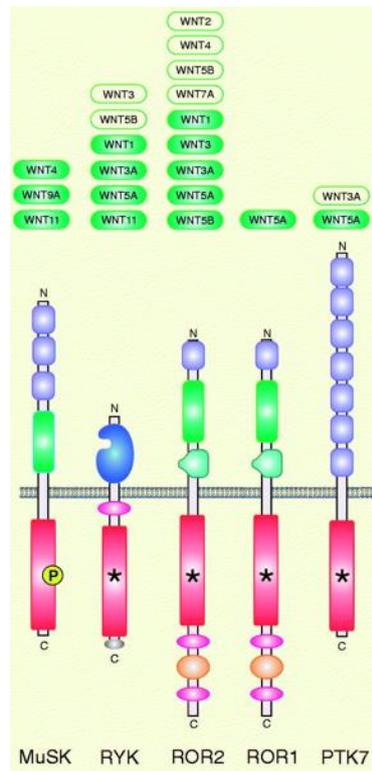


Figure 14: Représentation schématique du récepteur RYK et de ses ligands ainsi que d'autres récepteurs de liaisons Wnt³⁴.

C. Rôle dans les pathologies humaines

Les mécanismes de signalisation cellulaires liés à la liaison de ligands avec les pseudo-récepteurs de type RYK sont multiples. De ce fait, les effets en découlant sont multiples et dépendent fortement du contexte. Plusieurs rôles pathologiques de RYK ont été mis en évidence dans des contextes de déficience de la moelle épinière, dans la tumorigénèse ou encore les troubles neurodégénératifs³⁴.

Par l'activité de RYK qui est impliqué dans la voie de signalisation Wnt régulant la motilité, la différenciation cellulaire ou la polarité cellulaire, il n'est pas difficile d'imaginer que sa

dérégulation soit associée à la formation de cancers et les hémopathies malignes. Il est notamment décrit que RYK associé à la voie PCP est importante dans le processus de pathogenèse de LLC (leucémie lymphoïde chronique)³⁵ mais qu'il joue aussi un rôle dans le traitement des mélanomes.

Rôle dans les cancers et particulièrement dans le traitement des mélanomes :

Le rôle important de la pseudokinase RYK dans la résistance aux mélanomes a été démontré dans une étude de Anastas et al ; en 2014³⁶.

Dans la moitié des mélanomes, une mutation du gène BRAF est retrouvée. BRAF est un gène permettant le développement de nos cellules. La mutation de ce gène se traduit par sa modification et une dérégulation de la croissance cellulaire. De cette manière, BRAF muté permet aux cellules de mélanomes de croître beaucoup plus rapidement et de façon anarchique³⁷.

Même si différentes thérapeutiques existent pour cibler BRAF muté, les BRAFis (inhibiteurs de BRAF), la majorité des patients BRAF mutés développent une résistance aux BRAFis et rechutent³⁶.

Il semblerait que l'inactivation des récepteurs RYK inhiberait la croissance tumorale et sensibiliserait les cellules de mélanomes aux BRAFis. Ces résultats suggèrent donc qu'à l'inverse, l'inhibition de BRAF favoriserait la signalisation cellulaire via RYK entraînant une croissance tumorale accrue et des résistances thérapeutiques. En outre, RYK jouerait un rôle dans la résistance des cellules de mélanomes aux inhibiteurs de BRAF.

Rôle dans les pathologies neurodégénératives : exemple de la sclérose latérale amyotrophique (SLA):

La sclérose latérale amyotrophique est une pathologie neurodégénérative conduisant à la mort par une paralysie progressive due à la mort des motoneurons de cause encore inconnus. Il a été démontré dans plusieurs articles que la signalisation Wnt est altérée dans la SLA.

Plusieurs acteurs de la voie Wnt semblent jouer un rôle dans l'altération de la voie de signalisation cellulaire et en particulier le pseudo récepteur tyrosine kinase RYK³⁸.

RYK régulerait le guidage axonal et inhiberait la régénération des axones après une lésion de la moelle épinière. En outre, la signalisation Wnt/RYK est altérée chez un patient porteur de SLA, suggérant que la signalisation Wnt altérée peut contribuer à la neurodégénérescence dans la SLA^{38 39 40 41 42}. RYK jouerait également un rôle dans le syndrome squelettique rare de Robinow ou dans la maladie de Huntington³⁴.

Les différents articles cités décrivent donc RYK comme une pseudokinase important tant elle est impliquée dans de nombreux processus de dérégulations menant à différentes pathologies.

Le ciblage de cette pseudokinase est donc une stratégie importante et une nouvelle source potentielle de thérapies, qui rappelle l'importance du ciblage des pseudokinase encore trop peu étudiées.

Rôle dans les maladies hématopoïétiques :

Une étude de Karvonen et al.⁴³ nous apprend que RYK serait présent dans le tissu hématopoïétique, dans la plupart des cellules myéloïdes, lymphocytes T et B. Il est démontré que RYK aurait un rôle dans le maintien de la production de CSH (cellules souches hématopoïétiques), en état de repos en supprimant la prolifération cellulaire par la suppression de ROS (espèces réactives de l'oxygène) induite par Wnt5A, connu pour être un activateur de CSH^{44 45}. Il semble donc que Wnt5A régule la population de CSH et la production hématopoïétique via le récepteur RYK par la suppression de ROS. Il s'agit donc d'un rôle clés pour ce pseudo récepteur tyrosine kinase.

D. Approches thérapeutiques

Les approches thérapeutiques concernant le pseudo récepteur Ryk sont encore minimes. L'utilisation d'anticorps anti-Ryk permettrait la régénération des axones dans certaines pathologies⁴⁶.

Les approches thérapeutiques concernant le pseudo récepteur Ryk sont encore minimes. L'utilisation d'anticorps anti-Ryk permettrait la régénération des axones dans certaines pathologies⁴⁶.

1. Anticorps monoclonal IgG1k: RWD1

L'anticorps monoclonal RWD1 a été développé afin d'inhiber la fonction de RYK par sa liaison à Wnt5a. Cet anticorps pourrait donc moduler les différentes fonctions de RYK avec une potentielle application en pathologies humaines. L'équipe de Halford et al.⁴⁷, qui a mis au point cet anticorps monoclonal propose entre autre son utilisation dans le cas de l'inhibition de la signalisation Wnt/Ryk afin de contrer l'inhibition de croissance et de la récupération des axones après une lésion nerveuse⁴⁷. Cet anticorps pourrait également servir dans d'autres pathologies liées au pseudo-récepteur tyrosine kinase RYK Wnt-dépendant, notamment dans certains cancers comme celui de l'ovaire ou une surexpression de RYK a été corrélée à une diminution significative de la survie globale des patients⁴⁷.

CHAPITRE 3 : Développement de petites molécules chimiques inhibitrices de la voie de signalisation WNT/B-caténine par ciblage de l'interaction PTK7/B-caténine dans les cancers colorectaux

I. Préambule

J'ai eu l'honneur d'effectuer de mon stage de 5^e année de pharmacie au sein du Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM) pour une durée de 6 mois, sous la direction du Pr Jean-Paul Borg. Grâce à son affiliation avec l'INSERM, le CNRS, l'Université Aix-Marseille et le Centre de Lutte Contre le Cancer (Institut Paoli-Calmette - IPC), ce centre de recherche est un continuum entre recherche fondamentale, translationnelle et clinique en oncologie. Sa structure comprend près de 500 personnes réparties en 19 équipes de recherches et différentes plateformes technologiques.

Sa diversité et son niveau scientifique et technologique lui permettent d'aborder de multiples aspects de la recherche sur le cancer : de l'initiation tumorale en passant par son développement jusqu'à sa dissémination métastatique. L'oncologie y est abordée de différentes manières, que ce soit au niveau biochimique mais aussi au niveau cellulaire.

Bien que l'*in vitro* soit fondamentale dans la recherche, le CRCM dispose d'une animalerie grâce à laquelle l'*in vivo* est largement pratiqué lors des stades avancés des projets. De plus, sa proximité avec l'institut Paoli-Calmette permet d'étudier directement les prélèvements de patients, ce qui est un avantage conséquent pour un laboratoire de recherche.

II. PTK7

A. Introduction

Le cancer colorectal est un enjeu majeur de santé publique puisque chaque année, dans le monde, plus de 900 000 personnes le développent et pas moins de 450 000 patients en meurent⁴⁸. Avec ces chiffres il se classe au 3^o rang des cancers les plus fréquents chez l'homme et 2^o chez la femme et représente la 2^o cause de décès par cancer.

Les enjeux sont donc multiples notamment par un diagnostic plus précoce de la maladie, l'identification de nouveaux biomarqueurs permettant d'évaluer les risques de rechutes, l'adaptation de la prise en charge ou encore la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques *via* une meilleure caractérisation des acteurs moléculaires.

PTK7 est un récepteur membranaire appartenant à la superfamille des récepteurs à activité tyrosine kinase. PTK7 participe à la voie de signalisation Wnt, conservée au cours de l'évolution, jouant un rôle dans divers processus comme le développement embryonnaire et l'homéostasie tissulaire⁴⁹. Dans les CCR, certaines cellules tumorales sont le siège d'une réactivation de la voie WNT jouant un rôle déterminant dans la tumorigenèse et la dissémination métastatique notamment. Des études précédentes ont montré que PTK7 est surexprimé dans les CCR et que cette surexpression est associée à la survenue de métastases, à une réduction de la survie des patients non métastatiques ainsi qu'à une augmentation de la résistance aux chimiothérapies. Nous avons développé une voie alternative et originale aux anticorps monoclonaux basée sur la découverte de composés chimiques inhibiteurs de l'interaction PTK7/ β caténine afin de cibler directement les fonctions de PTK7 dans le contexte de la voie Wnt/ β caténine. En effet, cette voie étant également impliquée dans les CCR, le ciblage de cette interaction pourrait être d'un intérêt particulier.

B. Contextes et objectifs

Le côlon et le rectum font partie du tube digestif et ont pour fonction de terminer la digestion puis d'évacuer les selles. Les cancers colorectaux (CCR) regroupent toutes les tumeurs pouvant se développer sur l'une de ces deux parties anatomiques. Le cancer colorectal est un enjeu majeur de santé publique puisqu'il est le deuxième cancer le plus mortelle de nos jours avec environ 450 000 décès par an dans le monde chaque année⁵⁰.

Les CCR se développent le plus souvent de façon aléatoire et dans une moindre mesure dans le cadre de syndromes héréditaires (20% à 30%) ou à la suite de maladies inflammatoires de l'intestin⁴⁸. Certains facteurs de risque environnementaux existent et peuvent contribuer à sa survenue. L'effet protecteur de l'activité physique est établi, de même que l'effet néfaste du surpoids, d'une alimentation riche en viandes rouges et de la consommation d'alcool⁵¹.

Par la discrétion à long termes des symptômes, il est difficile de diagnostiquer ce cancer à un stade précoce de la maladie.

Le traitement des CCR repose essentiellement sur l'ablation de la tumeur au cours d'une coloscopie. Des chimiothérapies peuvent également être utilisées dans le cadre de traitement adjuvant afin de réduire les risques de récurrence. Les chimiothérapies des CCR font souvent appel à des associations de molécules comme le 5-Fluoro-Uracile (5-FU), la capécitabine, l'oxaliplatine et l'irinotécan⁵².

Malgré une utilisation large des chimiothérapies les effets indésirables sont nombreux et lourds de conséquences sur la qualité de vie des patients, de plus leur efficacité peut être compromise par une prise en charge trop tardive.

Aujourd'hui un ciblage plus spécifique de la tumeur est possible grâce au développement des thérapies ciblées. Ces nouvelles thérapies ciblent des voies de signalisation ou protéines exploitées par les cellules tumorales et directement impliquées dans la tumorigenèse. Elles permettent d'induire la mort des cellules cancéreuses par apoptose via l'inactivation de voie de signalisation oncogéniques, la stimulation du système immunitaire ou encore la délivrance d'agent chimio thérapeutique par anticorps⁵³. Ces thérapies ciblées permettent notamment de minimiser la toxicité sur les cellules voisines saines.

Les premières thérapies ciblées reposent sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux. Dans le cas des CCR, sont utilisés des anticorps monoclonaux dirigés contre les protéines EGFR ou VEGF par exemple.

L'activation de la signalisation en aval du récepteur à l'EGF est fortement impliquée dans la progression de tumeurs épithéliales dont les CCR. Des anticorps monoclonaux inhibant la signalisation EGFR ont donc été développés et sont utilisés dans le traitement des tumeurs exprimant l'EGFR, c'est le cas du cetuximab ou du panitumumab.

Le VEGF (Vascular Endothelial-derived Growth Factor) est un facteur de croissance sécrété par les cellules cancéreuses. Il est doté d'une forte activité angiogénique sur les cellules endothéliales. L'angiogenèse, qui est un processus complexe, aboutit à la formation de vaisseaux sanguins favorisant la croissance tumorale en apportant à la tumeur les nutriments nécessaires à sa croissance. Le bevacizumab, dirigé contre le VEGF-A, est le traitement anti-angiogénique de référence dans les CCR. En deuxième intention, d'autres traitements ciblant la voie du VEGFR sont disponibles comme le ramucirumab, autre anticorps monoclonal, ou encore l'aflibercept (protéine de fusion recombinante humanisée) et le regorafénib (inhibiteurs de protéines kinases).

Même si l'association des thérapies ciblées aux chimiothérapies a permis une amélioration de la survie des patients atteints de CCR métastatiques l'enjeu reste important et la découverte de nouvelles stratégies thérapeutiques via une meilleure caractérisation des acteurs moléculaires des CCR est essentielle.

Le récepteur PTK7, initialement identifié dans les mélanocytes et carcinomes du colon chez l'homme⁵⁴ est un récepteur membranaire appartenant à la superfamille des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK). PTK7 est considéré comme un récepteur atypique ou « pseudokinase » suite à un défaut d'activité enzymatique de son domaine kinase. Cependant, PTK7 peut indirectement participer à des voies de signalisation par hétérodimérisation avec d'autres récepteurs⁵⁵ (VEGFR, ROR2) et en agissant comme co-récepteur ou amplificateur de signal.

Ce récepteur est surexprimé dans de nombreux types de cancers épithéliaux dont les CCR mais également dans les sarcomes ou tumeurs hématologiques malignes. Sa surexpression dans les CCR est associée à la survenue de métastases et à une réduction de la survie des patients ainsi

qu'à un phénotype pro-migratoire et pro-métastatique *in vitro*⁵⁶. De plus PTK7 participerait à une augmentation de la résistance aux chimiothérapies, en particulier aux anthracyclines⁵⁶.

La structure de PTK7 est organisée en 20 exons codant pour un domaine extracellulaire composé de 7 domaines de type Immunoglobuline, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire comprenant le domaine kinase inactif.

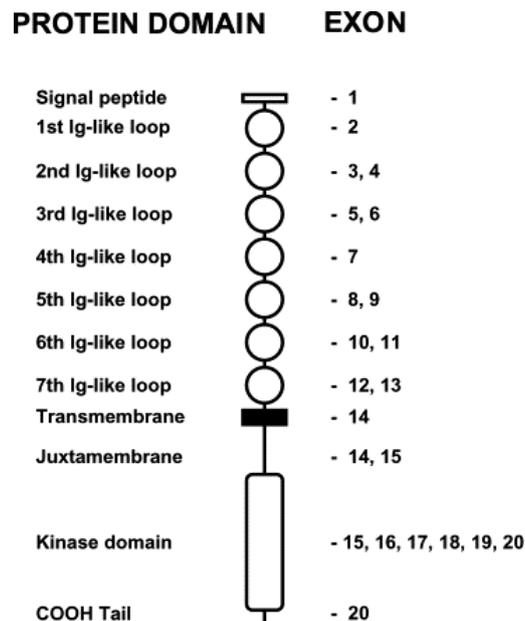


Figure 15 : Diagramme indiquant la contribution des différents exons à la participation de la structure protéique de PTK7 ⁵⁷.

PTK7 est un récepteur de la voie de signalisation WNT conservée au cours de l'évolution. La voie Wnt régule divers aspects fondamentaux comme la détermination du destin cellulaire, la migration cellulaire, la polarité cellulaire, la structuration neuronale ou l'organogenèse au cours du développement embryonnaire.

La voie WNT se divise en deux parties : la voie WNT canonique ou Wnt/ β -caténine, dépendante de la β -caténine et la voie WNT non canonique divisée également en deux axes dont la voie Wnt/Polarité cellulaire planaire (PCP) et la voie Wnt/Ca.²⁺

La voie Wnt non canonique participe non seulement à la morphogénèse tissulaire mais également à la migration et à la division cellulaire grâce à des mécanismes moléculaires encore mal compris. Les gènes de la polarité planaire codent pour des récepteurs membranaires tels que PTK7, VANGL2, ROR2, des ligands WNT et également des protéines cytoplasmiques de type échafaudage (DISHEVELLED, SCRIBBLE, PRICKLE1) ou à activité enzymatique (MINK1). Ces protéines sont engagées dans une voie de signalisation induisant l'activation de la protéine kinase JNK, impliquée dans le remodelage du cytosquelette d'actine nécessaire aux mouvements cellulaires, et jouant également un rôle de facteur de transcription.

La signalisation Wnt canonique est activée par suite de la liaison d'un des nombreux ligands Wnt (Wnt-3a, Wnt-2b...) à un complexe protéique composé du récepteur Frizzled (Fz) et du récepteur des lipoprotéines de basse densité liées à la protéine 6 (LRP6). En condition non stimulée, la protéine cytoplasmique β -caténine est dégradée par l'action du complexe de destruction composé de la protéine d'échafaudage Axin, du produit du gène suppresseur de tumeur adenomatous polyposis coli (APC), la Caséine Kinase 1 (CK1) et la Glycogène Synthase Kinase 3 (GSK3). En effet, la phosphorylation séquentielle de la β -caténine par CK1 et GSK3 va permettre son ubiquitinylation et son adressage au protéasome pour dégradation. En condition stimulée, la liaison du ligand Wnt au complexe récepteur Fz/LRP6 conduit à l'inhibition du complexe de dégradation et à la stabilisation de la β caténine qui pénètre alors dans le noyau pour s'associer aux facteurs de transcription de la famille Tcf/Lef. La β -caténine active la transcription de gènes cibles impliqués dans l'auto-renouvellement des cellules souches, la croissance et prolifération cellulaire⁵⁸.

Plusieurs études montrent qu'une dérégulation de la voie WNT/ β -caténine est fréquemment associée à la survenue et au développement des CCR⁵⁹. Dans les CCR, plusieurs mutations d'acteurs de la voie Wnt/ β caténine sont retrouvées, c'est notamment le cas de la β -caténine ou de l'Adenomatous Polyposis Coli (APC). Ces mutations entraînent une activation en continue de la voie Wnt/ β -caténine à l'origine des propriétés pro-tumorigéniques telles que l'auto-renouvellement des cellules souches cancéreuses, l'initiation tumorale, la dissémination métastatique ou la résistance aux traitements.

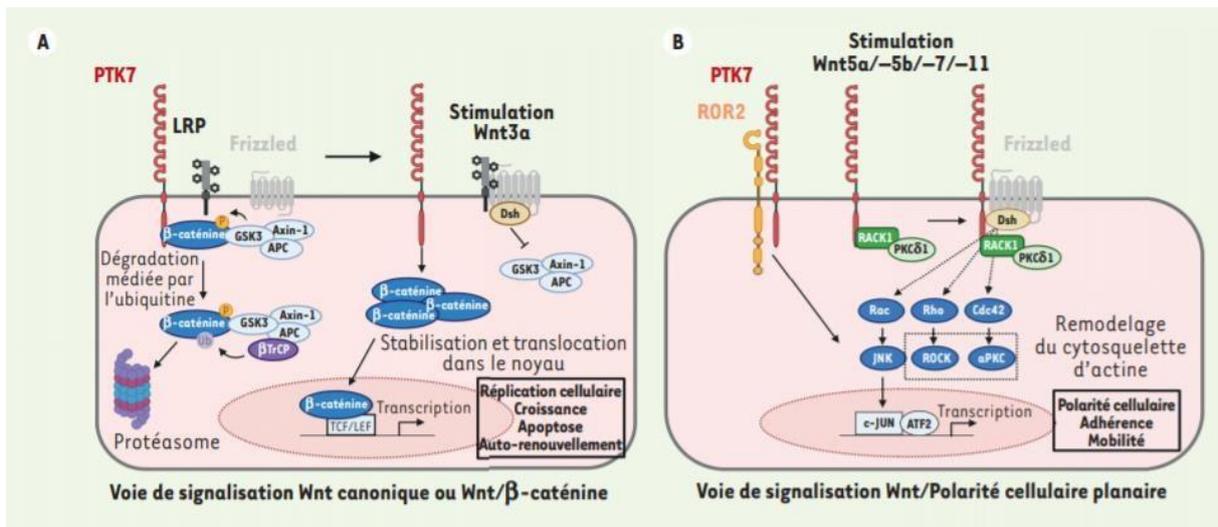


Figure 16 : Représentation schématique simplifiée des voies de signalisation Wnt/ β caténine (A) et Wnt/PCP (B) et rôle de PTK7 dans ces voies⁶⁰.

Une étude par double hybride réalisée au sein de l'équipe du Pr. JP Borg, a permis d'identifier la β -caténine comme nouvel interacteur de PTK7. Il a notamment été montré que cette interaction est dépendante du domaine kinase de PTK7 et joue un rôle dans l'activation de la voie Wnt/ β -caténine⁶¹. Toutefois le rôle de PTK7 dans le contexte de la voie Wnt/ β -caténine reste controversé⁶².

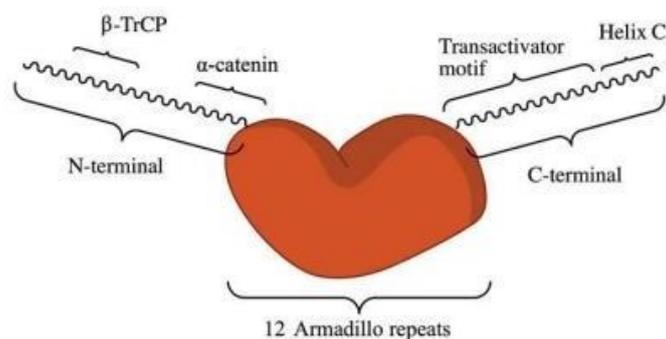


Figure 17 : Structure schématique de la β -caténine. La β -caténine est composée de 781 acides aminés avec un noyau composé de 12 répétitions Armadillo conservé au centre. Chaque répétition se compose de 40 acides aminés dans 3 hélices α . Les régions -N et -C terminales sont éloignées, non structurées et pas aussi conservées que la structure de répétition Armadillo.

PTK7 s'avère donc être une cible thérapeutique prometteuse dans les CCR. De nouveaux outils thérapeutiques ciblant PTK7 sont en développement mais un seul, à ce jour, a atteint les phases cliniques et consiste en un anticorps conjugué médicament (ADC). Cet ADC, développé par le groupe Pfizer-Abbvie Stemcentrx, a obtenu un brevet dans l'indication du traitement des cancers du sein triple négatif (TNBC), cancer de l'ovaire (OVCA) et cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC) (Damelin et al.201715).

Les anticorps conjugués médicaments sont des produits thérapeutiques composés d'anticorps monoclonaux qui sont dirigés spécifiquement vers des antigènes associés à la tumeur. Ces anticorps sont combinés à des agents cytotoxiques puissants grâce à des « lieux » de type chimiques. L'intérêt de cette technologie est l'effet ciblé du traitement qui permet de ne pas endommager les tissus environnant sains en adressant spécifiquement l'agent de chimiothérapie dans les cellules tumorales. Cette approche permet d'améliorer la tolérance du patient à son traitement. L'ADC anti-PTK7 est composé de l'anticorps h6M24, un dipeptide « lieu » et de la drogue, ici l'Auristatine Aur010 qui est un inhibiteur de microtubule. L'auristatine n'est pas utilisé seul comme médicament du fait de sa toxicité mais son utilisation couplée à un anticorps permet de diminuer les doses et d'en limiter ses effets indésirables.

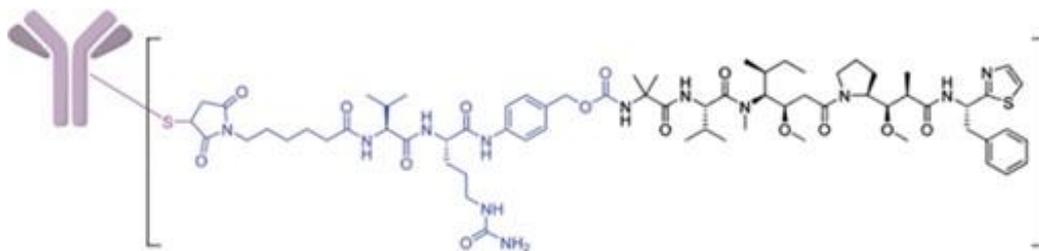


Figure 18: Structure de l'ADC anti-PTK7, composé de l'anticorps h6M24, du linker chimique (partie bleu) et de l'auristatine (partie noir)⁶³.

D'autres stratégies sont en développement mais n'ont pas encore atteint les phases cliniques. C'est le cas d'une construction CAR-T cell anti-PTK7. Les cellules T génétiquement modifiées exprimant des récepteurs antigéniques chimérique, appelées « CAR-T Cells » sont un nouvel espoir dans le traitement des cancers.



Les CAR-T cells anti-PTK7 se sont révélées efficaces *in vitro* et dans des modèles de xénogreffes dérivées de cancer du sein, poumon, pancréas, côlon et ovaire.

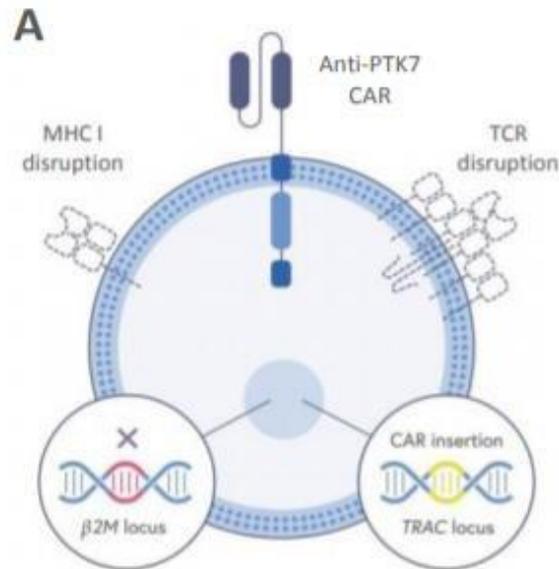


Figure 19 : L'édition du génome CRISPR/Cas9 des cellules T de donneurs sains est utilisée pour générer des CAR-T allogéniques anti-PTK7 cellules. Pour prévenir la GvHD, l'expression du TCR est supprimée par l'intégration spécifique au site d'une construction CAR spécifique à l'antigène dans le locus TRAC par réparation dirigée par homologie après avoir utilisé CRISPR/Cas9 pour introduire la cassure double brin.

Actuellement les stratégies thérapeutiques en développement n'utilisent que la capacité du récepteur PTK7 à être surexprimé par les cellules tumorales et il serait donc intéressant de développer de nouvelles stratégies permettant de bloquer directement ses fonctions. Toutefois, l'absence d'activité catalytique de son domaine kinase empêche le développement de composés chimiques inhibiteurs comme c'est classiquement le cas pour les RTKs. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés au développement d'inhibiteurs d'interaction protéine-protéine et plus précisément de l'interaction PTK7/ β -caténine impliquée dans l'activation de la voie Wnt/ β caténine.

Préalablement à mon stage, une chimiothèque ciblée de type « inhibiteurs d'interaction protéine-protéine » composée de 10314 molécules chimiques a été criblée grâce à la technologie NanoBRET™. Cette technologie permet la détection sensible et reproductible d'interactions

protéine-protéines dans l'environnement cellulaire naturel (*in cellulo*). Cette technique est notamment applicable pour des criblages à haut débit. Ce criblage haut-débit associé à un étude structure-activité par catalogue (commande et évaluation d'analogues chimiques) a permis d'identifier deux séries de composés comme inhibiteurs potentiels de l'interaction PTK7/ β -caténine : le hit 1065 et ses analogues 20269 et 20274 ainsi que le hit 3653 et ses analogues 20278 et 20279.

L'objectif de ce stage a été de confirmer l'effet biologique des analogues 20269 et 20278 dans le contexte de la voie Wnt/ β caténine sur différents modèles cellulaires de CCR. Un contrôle négatif (molécule 20262) a également été utilisé et représente un analogue de la molécule 3653 non sélectionné par le criblage NanoBRET™. Pour se faire différents tests cellulaires ont été mis en place :

- Test rapporteur TopFlash/Luciferase
- Analyse d'expression d'ARNmessenger par RT-qPCR
- Test de viabilité
- Analyse d'expression protéique par Western Blot

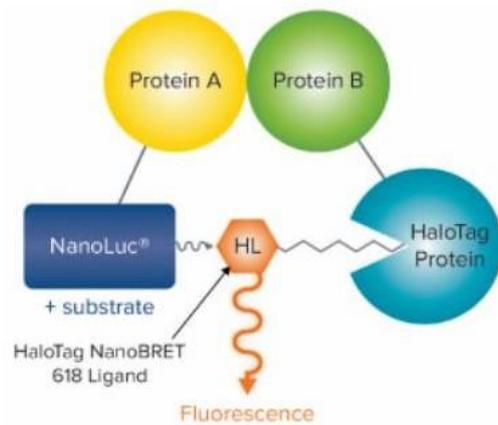


Figure 20: Principe de la technique Nano-BRET™

C. Matériels et méthodes

1. Culture cellulaire

Deux lignées cellulaires adhérentes provenant d'adénocarcinome du côlon ont été utilisées :

- La lignée HCT116 est cultivée dans un milieu Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 [Gibco®] supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) préalablement décomplémenté 30 min à 56°C.
- La lignée SW480 est cultivée dans un milieu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) [Gibco®] supplémenté avec 10% de SVF décomplémenté.

Les lignées cellulaires sont cultivées dans un incubateur dans des conditions standards de culture cellulaire (37°C, 5% CO₂, 95% humidité).

Les cellules sont décollées par trypsinisation avec une solution de trypsine/EDTA 0,25% [Gibco®].

2. Test de cytotoxicité au bleu d'Alamar

Principe :

Le bleu d'Alamar est une solution de colorant indicateur à base de résazurine pour l'analyse quantitative de la croissance cellulaire et un indicateur de la cytotoxicité de molécules chimiques. Le bleu d'Alamar subit un changement colorimétrique mesurable en fluorescence lorsqu'il est incubé avec des cellules métaboliquement actives. Ce réactif est conçu pour les études de viabilité et de prolifération cellulaires notamment.

Ainsi nous pouvons mesurer la fluorescence émise par chaque puit et en déduire un potentiel effet cytotoxique ou antiprolifératif de nos molécules.

Protocole :

Les cellules sont obtenues par décollement à l'aide d'une solution de trypsine/EDTA 0,25% puis re-suspendues à une densité cellulaire de 46700 cellules/mL (HCT116) ou 33300 cellules/mL (SW480). 150µL de suspension cellulaire sont déposés dans chaque puit d'une plaque 96 puits à fond plat traitée pour culture cellulaire (Falcon®) puis les cellules sont incubées 24h. L'effet des molécules est ensuite testé par addition de 25µL de solution de molécules, diluées au préalable au 4x dans le milieu cellulaire adéquat afin d'obtenir la concentration finale désirée. Les cellules sont ensuite incubées pendant 72h. 25µL de bleu d'Alamar sont alors ajoutés dans chaque puit suivi d'une nouvelle incubation de 4 à 8h selon les lignées cellulaires étudiées. La cytotoxicité est évaluée par mesure de la fluorescence dans chaque puit grâce à un lecteur de microplaques multi-modes CLARIOstar® [BMG-LabTech].

3. Western-Blot

Principe :

Le Western-Blot ou Immunoblot est une technique de biologie moléculaire permettant de détecter des protéines recherchées sur une membrane de nitrocellulose. La technique se déroule en plusieurs étapes:

- Préparation des échantillons
- Electrophorèse des protéines
- Transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose.
- Détection des protéines

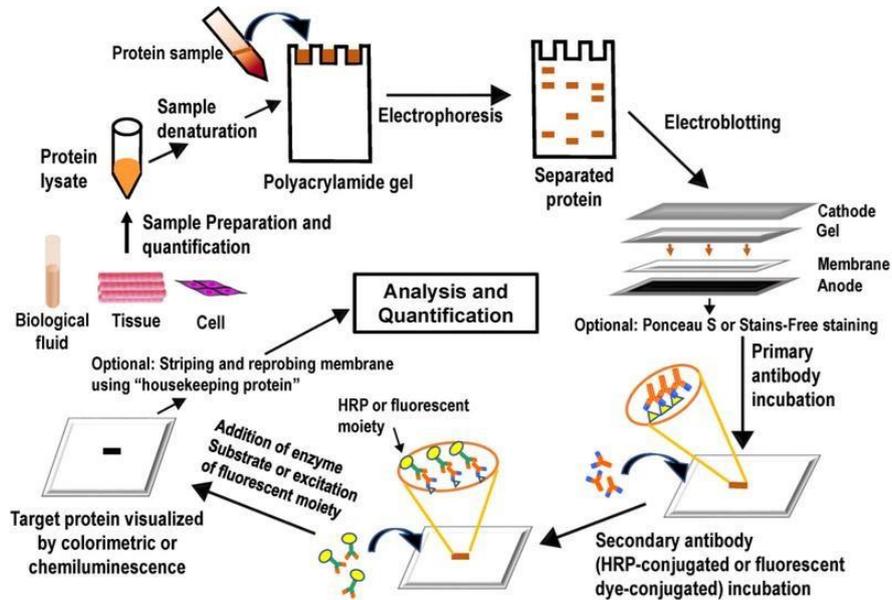


Figure 21 : Représentation schématique de la procédure de Western-Blot⁶⁴.

Protocole :

Préparation des échantillons :

Les cellules sont lavées en PBS 1X puis lysées dans un tampon de lyse RIPA (50mM TrisHCl pH8.0, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1% Triton X-100)) supplémenté extemporanément d'inhibiteur de protéases PIC (dilution au 1 :1000) et d'inhibiteurs de phosphatases (dilution au 1 :100) afin d'obtenir l'échantillon protéique.

Le lysat total est mis au rotateur 30minutes à 4°C puis centrifugé à 13 000rpm (rotations par minute) pendant 15 minutes à 4°C afin de récupérer le surnageant contenant les protéines.

La Concentration protéique des surnageants est déterminée par un dosage de Bradford (Biorad®) à l'aide d'une gamme étalon de BSA (Bovine Serum Albumin).

L'absorbance est mesurée et les échantillons sont équilibrés par dilution avec le tampon de lyse puis dénaturés à 95°C dans une solution de Laemmli 4X.

Electrophorèse des protéines :

Les échantillons protéiques et l'échelle de poids moléculaire [Amersham ECL Rainbow Marker Full Range – Sigmaaldrich] sont chargés sur un gel SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate – PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) puis placés dans une chambre de migration remplie de tampon de migration (10% Tris-Glycine + 0,1% SDS).

Dans un premier temps, l'extrait protéique est concentré sur le gel de concentration (Composition du gel à 8% 10mL : 4,9 mL d'eau MQ + 2,5 mL de tampon pH 8,8 + 2,7mL d'Acrylamide 40% + 50µL d'APS (Persulfate d'ammonium) 20% + 10µL de TMED (tetramethylethyldiamine)) pendant 20 minutes à 80V.

Dans un second temps les protéines sont séparées sur le gel de séparation (Composition du gel à 8% 5mL : 3,15 mL d'eau MQ + 1,25 mL de tampon pH 6,8 + 580 µL d'Acrylamide 40% + 25 µL d'APS 20% + 5µL de TMED) 2h à 140V.

Transfert des protéines :

Une fois la migration terminée, les protéines sont électro-transférées sur une membrane de nitrocellulose (GE Healthcare) pendant 1h30 à 80V et à température ambiante dans un tampon de transfert (10% Tris-Glycine + 10% EtOH).

L'efficacité du transfert est vérifiée par la coloration de la membrane au rouge Ponceau.

La membrane est saturée dans du TBS- 0,01% Tween-5% lait afin de bloquer les sites non spécifiques de fixation des anticorps. Cette membrane est ensuite incubée toute la nuit avec l'anticorps primaire en TBS1X-Tween 0,1% BSA 3% à 4°C sur plaque agitatrice.

Les anticorps primaires utilisés sont : les anticorps anti-PTK7 [rat] clone 31G9 (1/2000e), anti-β-caténine [Mouse] (1/1000e), anti-GSK3-β et P-GSK3β [Rabbit] (1/1000e) et anti-HSP70 [Mouse] dilués en TBS1X-Tween 0.1% BSA 3% comme contrôle.

La membrane est ensuite incubée avec l'anticorps secondaire couplé à une HRP (Peroxydase de raifort) dilué au 1/10000e en TBS-Tween 0,1%, 1% BSA 1h à température ambiante sur plaque agitatrice.

Les protéines sont révélées avec le kit ECL (Enhanced chemiluminescence), substrat de la peroxydase. Les images sont acquises à l'aide d'un imageur Gbox et traitées avec le logiciel GENESys. La quantification des protéines étudiées est réalisée grâce au logiciel ImageJ®

4. TopFlash

Principe

Cette technique permet d'étudier la réponse transcriptionnelle dépendante de la β -caténine et donc l'activité de la signalisation Wnt/ β caténine. Le topflash est un plasmide rapporteur du facteur de transcription TCF/Lef impliqué dans la voie Wnt/ β caténine, (facteur de transcription : T Cell Factor) placé en amont d'un gène rapporteur de luciférase. Le Fopflash comprend également le gène rapporteur du TCF/Lef mais inactif à la suite de l'insertion de mutation et est utilisé comme contrôle négatif.

La mesure du signal luminescent induit par l'activité de la luciférase permet l'identification de facteurs capables de moduler la voie de signalisation Wnt/ β caténine.

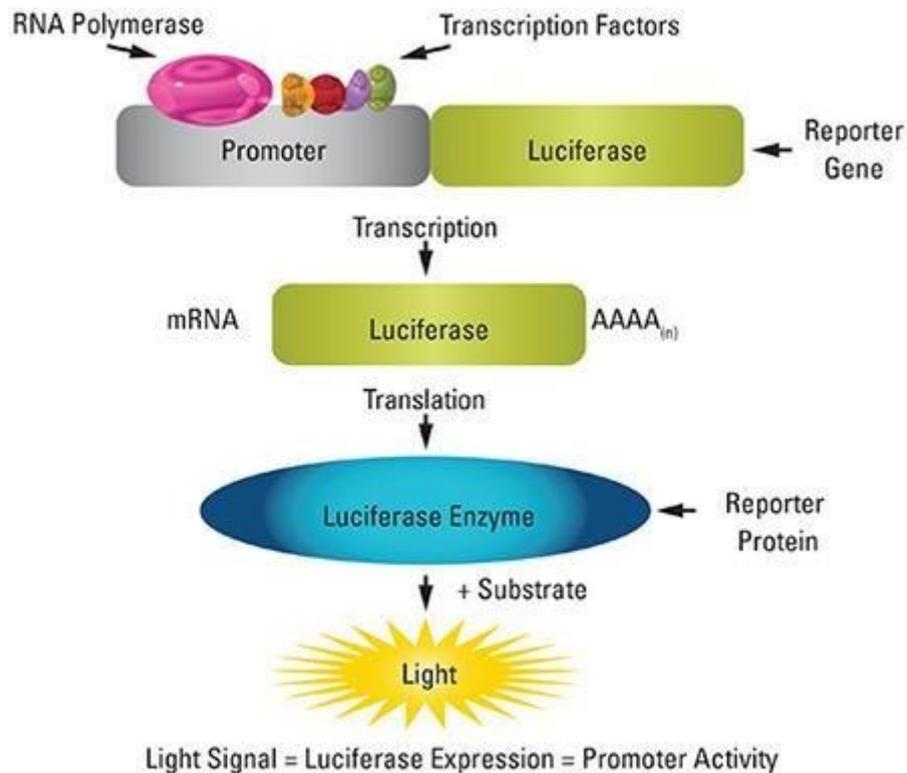


Figure 22 : Représentation schématique du test essai de rapporteur de la luciférase

Protocole :

Les cellules sont décollées à l'aide d'une solution de trypsine/EDTA 0,25% puisensemencées dans une plaque 24 puits à fond plat transparente (Corning-Falcon® 353504) à la densité cellulaire de 1×10^4 cellules par puits dans du milieu RPMI 1640 supplémenté avec 10% de SVF décomplémenté.

Les cellules sont incubées pendant 48h.

Les cellules sont transfectées grâce à un mix de transfection comprenant pour un puit, un premier mix composé de 30µL d'Opti-MEM + 0,6µL de Plus Reagent + 500ng de Topflash ou Fopflash + 70ng de Renilla Luciférase et un deuxième mix composé de 30µL + 1,2µL de lipofectamine LTX est également préparé. Ces deux mix sont mélangés puis incubés pendant 10min. Ce mix est alors ajouté aux cellules et incubé pendant 8 heures minimum.

Les cellules sont ensuite traitées sur la nuit (≈ 16 heures) à une concentration finale de 10µM et 25µM pour chaque drogue.

Enfin, les cellules sont lavées en PBS1X puis lysées 15 minutes à température ambiante sous agitation dans du Passive Lysis Buffer 1X. 10 μ L de lysat sont prélevés et déposés dans une plaque blanche 96 puits (Falcon®). 10 μ L de Luciferase Assay Substrate replit au préalable dans du Luciferase Assay Buffer II [Promega] sont ajoutés au lysat permettant la mesure de l'activité de la Firefly Luciférase à l'aide du CLARIOstar Plus Microplate Reader [BMG Labtech].

Enfin, 10 μ L de Stop and Glo Reagent [Promega] sont ajoutés afin de mesurer l'activité de la Renilla Luciférase (utilisée comme contrôle de transfection de normalisation).

Les résultats sont calculés grâce à la formule suivante : (TopFlash Firefly/TopFlash Renilla)/(FopFlash Firefly/FopFlash Renilla).

5. RT-qPCR

Principe :

La réaction de polymérisation quantitative en chaîne par transcription inverse est une méthode de biologie moléculaire de choix pour la quantification de l'amplification de l'ADN. Cette technique permet de dupliquer en grand nombre, une séquence d'ARN ou d'ADN à partir d'une faible proportion d'acides nucléiques et d'oligonucléotides constituant les amorces.

A partir d'un échantillon d'ARN messager (ARNm) qui est rétro transcrit grâce à une enzyme : la transcriptase inverse, l'ADN complémentaire (ADNc) est obtenu, nous pouvons ensuite l'amplifier grâce à une PCR classique.

Protocole :

1) Traitement des cellules :

Les cellules sont lavées et décollées par une solution de trypsine/EDTA puisensemencées dans une plaque 6 puits transparente à fond plat (Falcon®) dans du milieu RPMI 1640 supplémenté avec 10% de SVF décomplémenté.

Les cellules sont incubées 24h puis elles sont traitées par les molécules à une concentration finale de 20 ou 25 μ M. Les cellules sont à nouveau incubées 24h.

2) Extraction de l'ARN

L'ARN est extrait à l'aide du RNeasy Mini Kit (Qiagen). Les cellules sont lavées une fois en PBS1X sur glace puis lysées dans 350µL de tampon RLT. Le lysat est mélangé dans un volume équivalent d'éthanol 70% puis transféré dans une RNeasy Spin Column et centrifugé 30 secondes à 13 000 rpm. 350µL de tampon RW1 sont ajoutés dans la colonne qui est à nouveau centrifugé 30sec à 13000rpm. 10µL de DNase dilué dans 70µL de tampon RDD (DNA Digestion Buffer) sont incubé 15 minutes à température ambiante sur chaque colonne afin de permettre la digestion d'ADN extracellulaire. Ensuite, 350µL de tampon RW1 sont ajoutés dans la colonne de nouveau centrifugé 30 secondes à 13 000rpm. 500µL de tampon RPE sont ajoutés et la colonne est centrifugé dans les conditions précédentes afin de laver la membrane. 500µL d'éthanol 80% est ajouté puis le tube est centrifugé 2minutes à 13 000rpm pour laver la membrane.

La membrane est centrifugée 5 minutes à 13 000 rpm.

Enfin, 20µL d'eau exempte d'enzyme dégradant l'ARN est ajouté à la membrane. Le tube est centrifugé 1minute à 13 000 rpm pour éluer l'ARN.

La concentration est évaluée grâce à un spectrophotomètre NanoDrop ND-1000 [Labtech].

3) RT

Par condition, un mix de 1µL de random primers et 1µL de dNTP (Désoxyribonucléoside triphosphate) est préparé puis ajouté dans un tube à PCR (Thermowell GOLD PCR). 1µg d'ARN est ajouté au mix et le volume est complété à 13µL avec de l'eau DEPC (eau traitée au diéthylpyrocarbonate). La transcription inverse est lancée avec un programme classique à l'aide d'un thermocycleur [Applied Biosystems SimpliAmp Thermal Cycler- ThermoFisher® Scientific] :

- chauffage 5minutes à 65°C

- pause

- un mix de : 4µL de 5XFS + 1µL de 0,1 DTT + 1µL de RNase OUT et 1µL de superscript II est ajouté par condition.

La suite du programme est lancée :

- 2 minutes à 20°C
- 10 minutes à 25°C
- 50 minutes à 50°C
- 10 minutes à 55°C
- 15 minutes à 70°C

4) qPCR :

Les cDNA obtenus par RT sont dilués au 1/10e en eau.

Le mix suivant est ajouté dans chaque puit d'une plaque PCR : 12,5µL de SYBR Green mastermix (ThermoFischer scientific) 2X + 0,75 µL de primers Forward et Reverse du gène d'intérêt + 6µL d'eau. 5µL de cDNA sont ajoutés à ce mix. Le programme de PCR est lancé avec le thermo-cycleur Bio-RAD C1000 Touch Thermal Cycler CFX96 et les données sont analysés à l'aide du logiciel Analysis Biorad CFX manager.

D. Résultats

Comme mentionné dans l'introduction, la voie Wnt/ β -caténine est fréquemment altérée dans les CCR par suite de mutations de différents acteurs de cette voie. C'est pourquoi nous avons utilisé au cours de cette étude deux modèles cellulaires différenciés par leur statut mutationnel. La lignée HCT116 est hétérozygote pour la β -caténine. Un allèle est sauvage tandis que la deuxième présente une mutation entraînant la suppression d'une sérine en position 45 normalement impliquée dans la régulation négative de la β -caténine suite à la phosphorylation par GSK3. La deuxième lignée étudiée, la lignée SW480, présente une mutation du gène APC résultant en une protéine tronquée ne possédant plus son domaine de liaison à la β -caténine. Ces deux mutations résultent en une accumulation cytoplasmique de la β -caténine et en une activation en continue de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine

1. Identification d'inhibiteurs de PTK7/ β caténine ciblant la voie de signalisation Wnt dans les cellules CRC

Afin d'évaluer l'effet des composés sélectionnés sur l'activation de la voie Wnt/ β -caténine, nous avons utilisé le test rapporteur TopFlash/Luciférase. Pour chaque lignée cellulaire, les molécules 20262, 20274 et 20278 à 10 μ M et 25 μ M ont été testées.

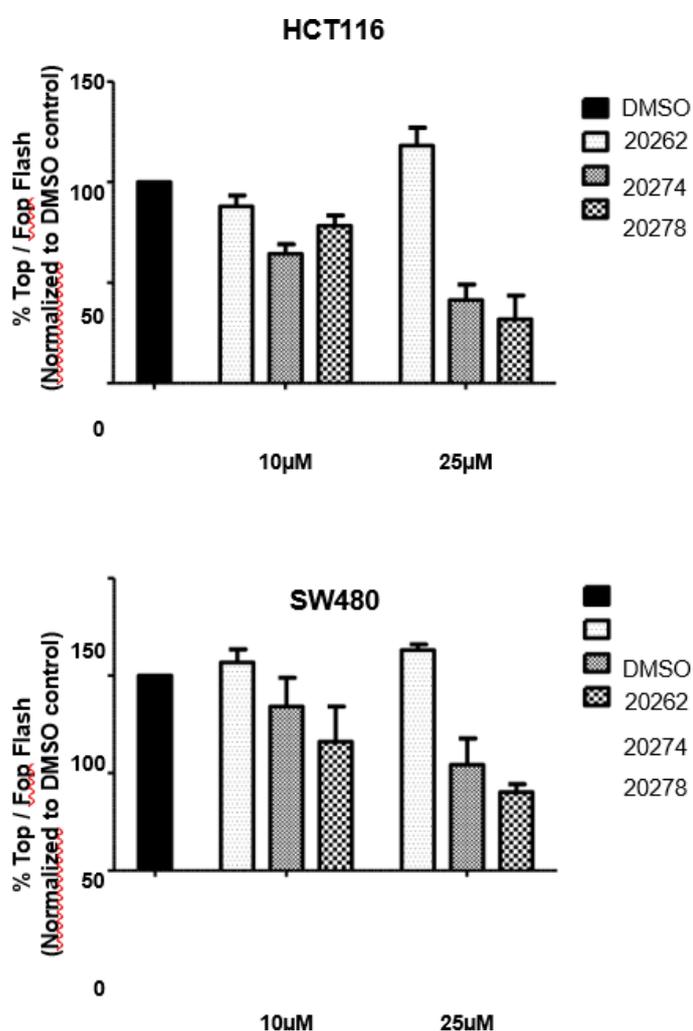


Figure 23: Effet des différents composés sur la voie de signalisation WNT. Les lignées de cellules CRC HCT116 et SW480 ont été incubées overnight avec les différents composés à 10 et 25 μ M. L'activité de signalisation WNT a été mesurée en utilisant le test de rapporteur TopFlash/Luciférase normalisé avec l'activité FOP et exprimée en pourcentage de cellules témoins traitées avec du DMSO. Les résultats sont exprimés en moyenne de 3 expériences indépendantes \pm SD

Pour les deux lignées nous pouvons observer une inhibition de l'activité de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine de façon dose-dépendante pour les composés 20274 et 20278. En effet les deux molécules présentent une inhibition de la voie Wnt de l'ordre de 20-30% à 10 μ M avec un effet augmenté à 50 et 70% d'inhibition à 25 μ M. A ce stade, pas de différences majeures ne peuvent être observé entre les deux lignées suggérant un effet indépendant du statut mutationnel. Compte tenu des résultats ci-dessus, nous pouvons suggérer que l'inhibition de PTK7/ β caténine avec de petites molécules atténue l'activation de la signalisation Wnt dans les cellules CRC.

2. L'inhibition de l'interaction PTK7/ β caténine par de petites molécules module l'expression des gènes cibles de la signalisation WNT dans les cellules CRC

Afin d'approfondir le rôle de ces molécules sur la signalisation Wnt, j'ai étudié l'expression du gène AXIN2 par RT-qPCR. AXIN2 est une cible bien caractérisée de la voie Wnt/ β caténine et agit comme rétrocontrôle négatif afin de limiter l'activité de la voie de signalisation Wnt.

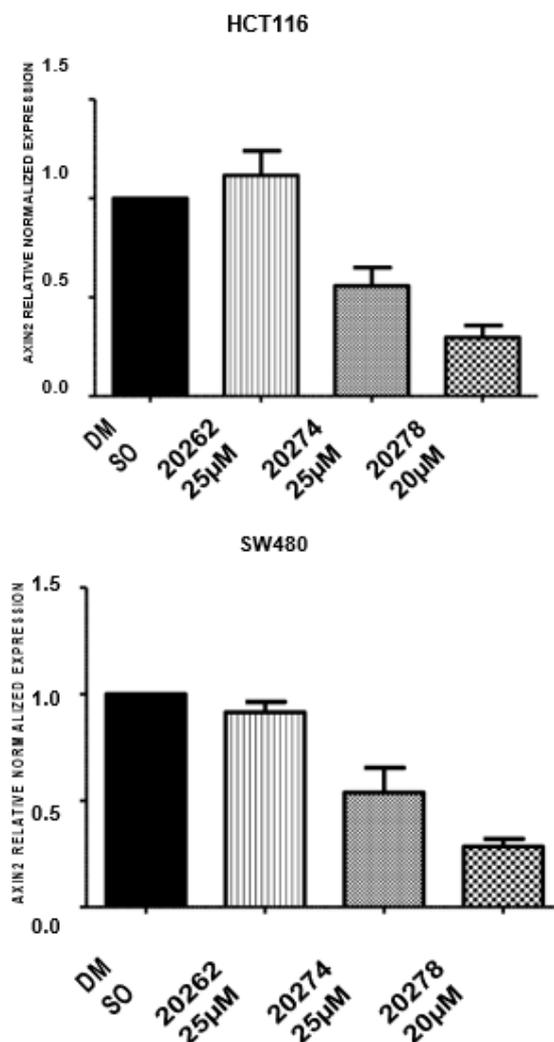


Figure 24: Effet des différents composés sur la voie de signalisation wnt par RT-qPCR. Les cellules ont été traitées 24 h avec les composés aux concentrations voulues. Les données montrent les niveaux relatifs d'ARNm du gène Axin2 dans les groupes d'échantillons par rapport au groupe témoin DMSO.

Ici également, peu de différences sont faites entre les lignées HCT116 et SW480. Dans les deux cas la molécule 20262 « contrôle négatif » ne présente pas d'effet sur l'expression d'Axin2, à la différence des composés 20274 et 20278. En effet, ces deux molécules présentent une régulation négative d'AXIN2 avec une efficacité plus importante pour la molécule 20278 (régulation négative d'environ 60% contre 40% pour la molécule 20274).

Pour conclure, ces données montrent que les inhibiteurs de PTK7/ β caténine induisent une expression différentielle du gène cible de la voie Wnt AXIN2

3. L'inhibition de l'interaction PTK7/ β -caténine est cytotoxique pour les cellules de CCR

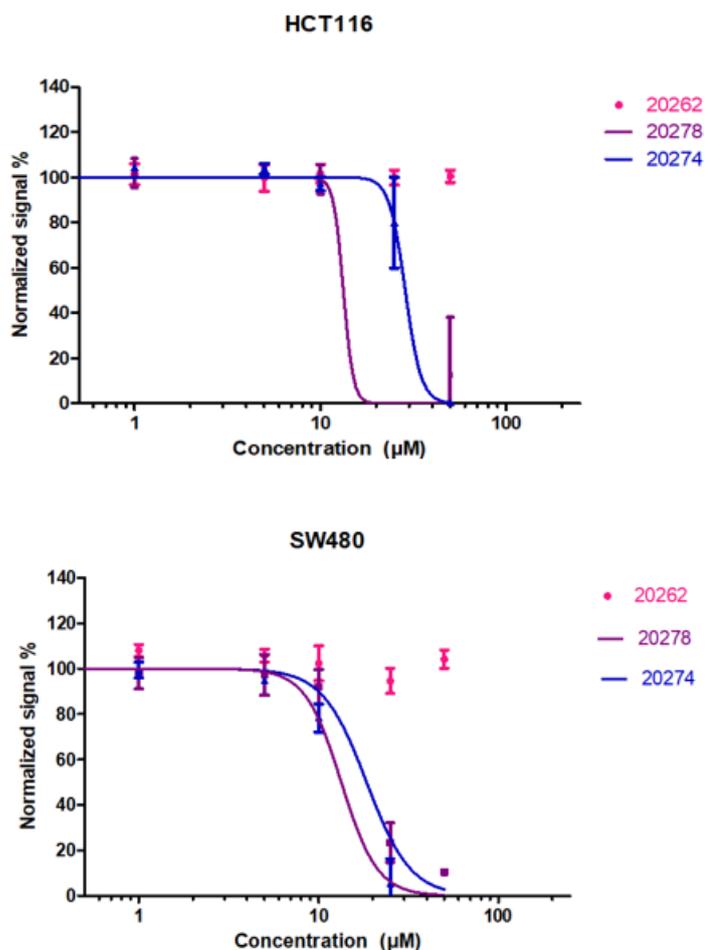


Figure 25 : Impact des composés 20274, 20278 et 20262 sur la viabilité des cellules HCT116, SW480 *in vitro*. Les cellules ont été incubées pendant 72h avec une concentration croissante de composés. La viabilité cellulaire a été évaluée par le test Alamar Blue et exprimée en pourcentage de cellules contrôle traitées avec du DMSO. Les points représentent la moyenne de trois expériences indépendantes et les barres sont l'écart-type.

IC50 (μM)	20262	20274	20278
HCT116	Not converged	28,65	13,31
SW480	Not converged	18,47	13,36

Figure 26 : Tableau des IC50 des molécules testées en cytotoxicité.

Afin d'évaluer l'effet antiprolifératif des composés 20274, 20278 et 20262 j'ai réalisé un test de cytotoxicité par bleu d'Alamar sur les lignées HCT116 et SW480.

La molécule 20274 présente une IC50 (Concentration réduisant la viabilité cellulaire de 50%) d'environ 30 μM pour la lignée HCT116 contre 20 μM pour la lignée SW480. Sur ce test fonctionnel, la molécule 20274 semble donc présenter une cytotoxicité plus importante sur la lignée SW480 alors que peu de différences ont pu être observées à 25 μM sur les tests précédents.

Concernant la molécule 20278, ce différentiel entre les deux modèles cellulaires n'est pas observé. En effet, cette molécule présente une IC50 d'environ 15 μM pour les deux lignées.

De façon cohérente avec les résultats obtenus avec le test de TopFlash et l'analyse en RT-qPCR, la molécule 20278 semble être ici aussi plus efficace que la molécule 20274.

Enfin le traitement des lignées HCT116 et SW480 avec la molécule 20262 n'entraîne pas de cytotoxicité cellulaire même aux plus fortes doses ce qui laisse supposer que la cytotoxicité observée avec les composés 20274 et 20278 est spécifiquement associée à l'inhibition de l'interaction PTK7/ β -caténine.

4. Visualisation de l'expression protéique de PTK7 et β -caténine par des cellulestraitées par les inhibiteurs 20262 et 20278

➤ Western-Blot

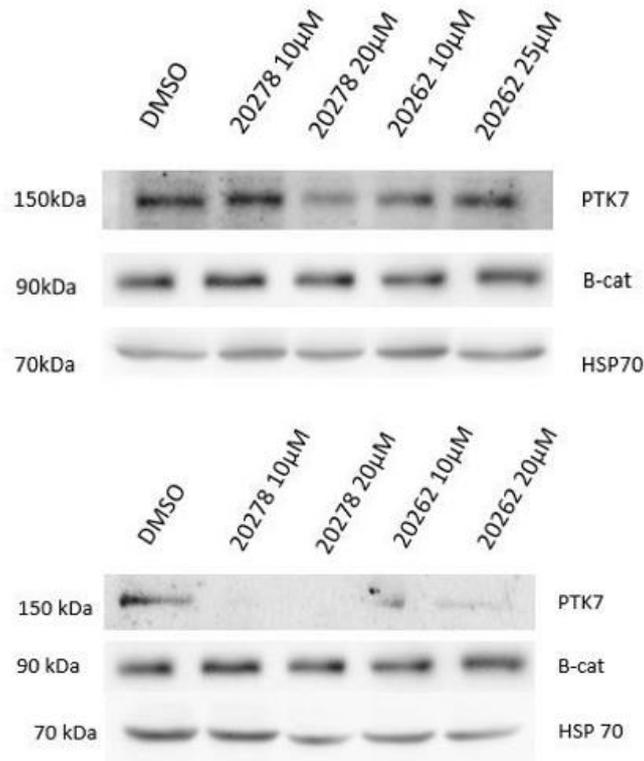


Figure 27 : Les lysats cellulaires totaux ont été extraits des cellules HCT116 et SW480 pour examiner les niveaux d'expression de PTK7 et β caténine par western blot

Afin d'identifier un éventuel mécanisme à l'origine de l'inhibition de la signalisation Wnt par nos composés, j'ai évalué l'expression des protéines PTK7 et β -caténine après traitement.

Concernant la lignée HCT116, nous pouvons observer une diminution de l'expression de PTK7 après traitement par la molécule 20278 à 20 μ M seulement. L'expression de la β -caténine ne semble pas altérée. La molécule contrôle 20262, n'induit également pas d'effet sur l'expression de ces deux protéines ce qui confirme ici aussi la spécificité de l'effet observé avec la molécule 20278. La protéine HSP70 est un contrôle de charge permettant de s'assurer que la même quantité de protéine a été déposée dans chaque puit. En effet, son expression ne change pas suite au traitement par les molécules et permet donc une normalisation des résultats observés.

Concernant la lignée SW480, l'expression de PTK7 semble nettement diminuée suite au traitement par la molécule 20278 à 10 comme à 20 μ M. Toutefois, tout comme pour la lignée HCT116, l'expression de la β -caténine ne semble pas altérée suite au traitement par la molécule 20278. La voie de signalisation Wnt est normalement inhibée suite à la dégradation de la β -caténine qui ne peut alors plus activer les facteurs de transcription. La β -caténine ne semble pas dégradée ici puisque son expression ne change pas par suite des traitements par nos composés ce qui suggère donc l'implication d'un autre mécanisme de régulation.

E. Discussion et conclusion

PTK7 joue un rôle certain dans la tumorigenèse de plusieurs cancers suite à sa surexpression.

Dans cette étude, nous avons pu identifier de nouvelles molécules chimiques inhibant l'interaction PTK7/ β -caténine et ciblant la voie de signalisation Wnt/ β -caténine altérée dans les cancers colorectaux. Dans les CCR, la voie Wnt/ β -caténine est continuellement activée suite à une accumulation de la β -caténine cytoplasmique. De ce fait, le ciblage d'acteurs de la voie en amont de la β -caténine semble ne pas être une stratégie idéale. Toutefois, nous avons montré grâce au test de TopFlash que l'inhibition de l'interaction PTK7/ β -caténine permet bien d'induire une inhibition de la signalisation Wnt indépendamment des anomalies moléculaires retrouvées en aval (mutations APC ou β -caténine).

Nous avons ensuite réalisé une analyse plus approfondie afin de confirmer cela. Tout d'abord, nous avons analysé l'expression d'un gène cible clé de la voie Wnt : AXIN2 ce qui a confirmé

les effets obtenus en TopFlash. En effet, nos deux composés d'intérêt induisent une régulation négative d'AXIN2⁶⁵ en accord avec une inhibition de la signalisation Wnt.

Afin d'évaluer les conséquences fonctionnelles de cette inhibition, nous avons réalisé un test de cytotoxicité par Bleu d'Alamar. Dans l'ensemble nous avons pu observer une cytotoxicité des composés sur les deux lignées (la molécule 20274 semble moins efficace sur la lignée HCT116). Toutefois, ce test donne un aperçu global de la viabilité cellulaire mais ne permet pas de différencier un effet antiprolifératif d'un effet pro-apoptotique. Des études complémentaires seront donc nécessaires pour étudier ce point. Notamment, une analyse du cycle cellulaire ainsi que de l'apoptose par cytométrie de flux pourront être réalisés. La voie Wnt/ β -caténine présente de nombreux gènes cibles impliqués dans la prolifération cellulaire et le développement d'inhibiteurs de l'interaction β -caténine/TCF4⁶⁶ ciblant également la voie Wnt/ β -caténine a mis en évidence un arrêt du cycle cellulaire. Il sera donc intéressant de voir si l'inhibition de notre interaction d'intérêt conduit à un mécanisme similaire.

Enfin, pour avoir une idée du mécanisme moléculaire potentiellement impliqué nous avons analysé l'expression des protéines PTK7 et β -caténine. De façon générale, l'expression de la β -caténine n'est pas altérée. L'inhibition de la voie Wnt/ β -caténine par nos composés pourrait donc être expliquée par une relocalisation de la β -caténine au sein d'autres complexes moléculaires à la membrane plasmique, indépendants de la voie Wnt/ β -caténine tels que E-cadhérine ou EpCAM. Une interaction renforcée de la β -caténine avec ces protéines impliquées dans l'adhésion cellule-cellule limiterait sa disponibilité pour activer les facteurs de transcription nucléaire. Pour cela, il serait intéressant de mettre en place des tests d'immunofluorescence permettant de visualiser la localisation subcellulaire des protéines d'intérêt ou encore des tests de co-immunoprécipitation afin de réaliser une étude semi-quantitative des interactions protéiques β -caténine/E-cadhérine par exemple.

L'étape suivante serait d'évaluer l'efficacité de nos composés sur des modèles *in vitro* plus transposables à l'homme comme les organoïdes. Les organoïdes sont des structures multicellulaires tridimensionnelles (3D) reproduisant *in vitro* la micro-anatomie d'un organe.

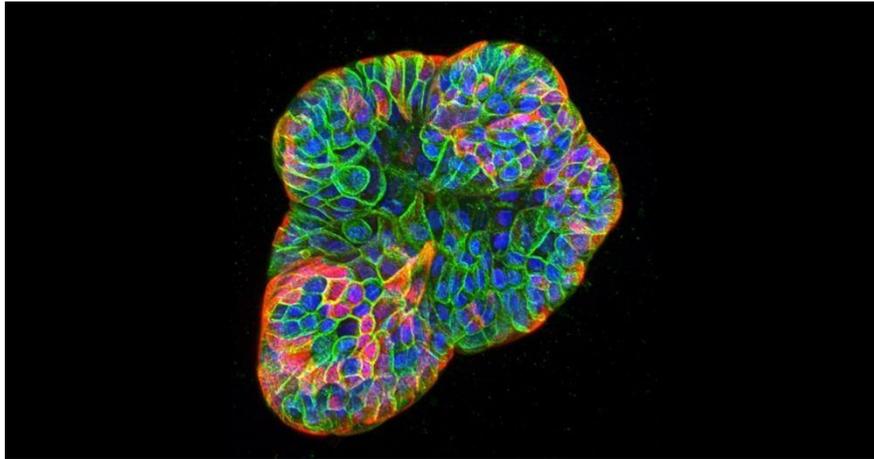


Figure 28: Organoïde digestif de patient.

Enfin, il serait envisageable de tester les drogues *in vivo* notamment dans un premier temps sur le développement d'embryon de Xénope qui est un modèle bien connu permettant d'étudier la signalisation Wnt/ β -caténine⁵⁵.

Le ciblage de cette interaction, dans les CCR, semble donc prometteuse mais pour l'instant les concentrations nécessaires pour obtenir des effets fonctionnels sont encore trop importantes et limitent leur transfert pour des études *in vivo*. Bien que des effets soient observés sur la voie de signalisation WNT/ β -caténine, le mécanisme d'action de ces molécules reste encore mal compris, ce qui est un enjeu au regard de l'hétérogénéité tumorale et des différentes réponses possibles des cellules cancéreuses aux différentes drogues.

CHAPITRE 4 : Intérêt d'une théranostique ciblant les pseudo-récepteurs tyrosines kinases

I. Diagnostic en oncologie : contexte et besoins

Comme vu dans la partie précédente, les molécules développées permettant d'inhiber l'interaction PTK7/B-caténine ne sont pour le moment pas utilisables in vivo mais le ciblage du pseudo-récepteur tyrosine kinase constitue tout de même un espoir dans le traitement de certains cancers comme le CCR. Même s'il est impossible d'utiliser ces molécules pour un usage curatif en oncologie en l'état, le ciblage des pseudo-tyrosines kinases à des fins de diagnostic ou en combinaison théranostique est une partie tout aussi importante. En effet, il n'existe à ce jour aucune méthode d'évaluation et de quantification fiable de l'expression du pseudo récepteur tyrosine kinase PTK7 par exemple. Il serait intéressant de développer une méthode diagnostique permettant de visualiser en corps entier l'expression du pseudo-récepteur d'intérêt. Tout comme cela est déjà fait pour d'autres types de maladies, l'imagerie moléculaire par tomographie par émission de positons (TEP) ou scintigraphie (TEMP) est une voie de développement intéressante. Aujourd'hui, peu de techniques diagnostiques ciblant les pseudo-récepteurs tyrosines kinase sont utilisées en soins courant bien que l'on connaisse la valeur péjorative d'un diagnostic prédictif de la surexpression de PTK7 .

II. Notion de théranostique

Issu de la contraction des mots « thérapie » et « diagnostic » ce concept s'inscrit dans le cadre d'une médecine personnalisée. Son but est de cibler de manière spécifique une tumeur à traiter. Grâce à l'imagerie le profil d'expression ainsi que le comportement des tumeurs peut être « catégorisé » afin de traiter au mieux le patient. Avec la théranostique tout est mis en œuvre pour proposer le traitement spécifique le mieux adapté à un cancer en particulier. Cette technique repose sur l'identification d'un biomarqueur dont la présence ou l'absence est témoin d'un processus biologique et son évolution d'une potentielle réponse aux traitements proposés. Les avantages attendus de cette technique sont un traitement mieux ciblé, plus sûr dans le cadre d'une médecine de précision, moins de toxicité en découlant, une réduction des effets iatrogènes, une prise en charge plus précoce des pathologies et une économie pour le système de santé.

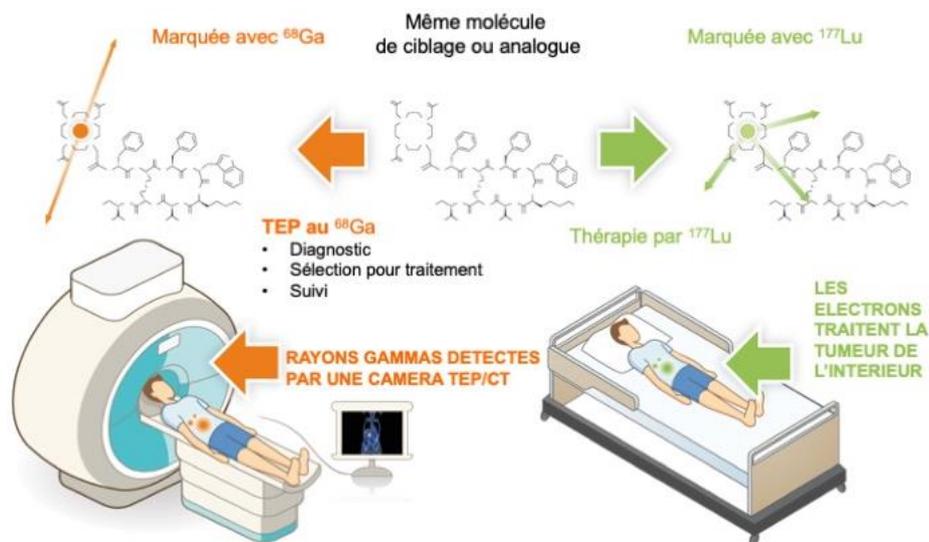


Figure 29 : schéma du concept de « théranostique ». Un même vecteur peut être radiomarqué avec un radionucléide à visée d'imagerie pour diagnostiquer la maladie (à gauche sur le schéma), ou radiomarqué avec un radionucléide à visée thérapeutique pour traiter la maladie (à droite sur le schéma) et permettre un suivi thérapeutique.⁶⁷

III. Tomographie par émission de positrons (TEP)

La tomographie par émission de positons (TEP) est une modalité d'imagerie moléculaire qui repose sur le principe de l'utilisation de radiotraceurs composés d'une molécule vectrice (apportant la spécificité de ciblage pour une molécule donnée ou pour un processus métabolique donné) couplée à un radionucléide émetteur de positon (β^+). Le plus connu des médicaments radiopharmaceutiques est le 18-fluorodéoxyglucose (^{18}F FDG). Cette molécule étant composée d'un analogue du glucose, elle va être absorbée par tous les tissus sains consommateurs de glucose pour leur métabolisme de base, mais en impasse métabolique, résultant en une accumulation décuplée par la plupart des tumeurs (effet Warburg) permettant leur détection.

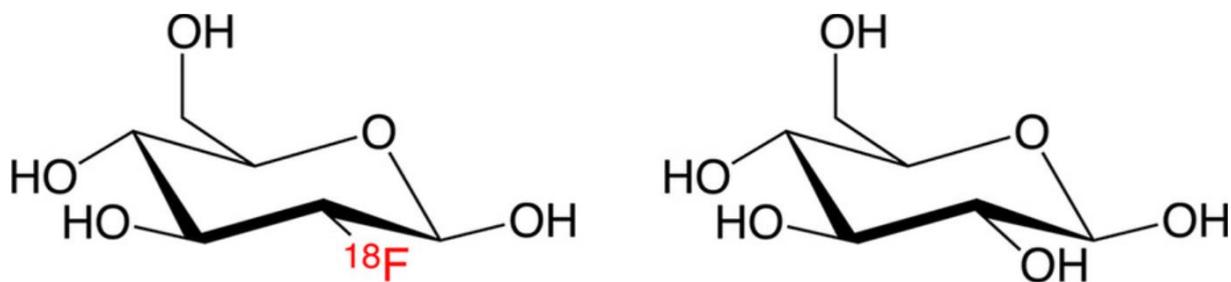


Figure 30 : Structure du FDG (à gauche) très similaire à celle du glucose (à droite)⁶⁸.

L'imagerie TEP est depuis une vingtaine d'années utilisée à des fins diagnostiques et d'éligibilité ou de suivi thérapeutique. En France le seul couple théranostique ayant une AMM dans l'indication du diagnostic et traitement des tumeurs neuroendocrines digestives (TNE) est le couple ^{68}Ga -DOTA-TOC/ ^{177}Lu -DOTA-TATE. Le ^{177}Lu DOTA-TATE est commercialisé sous le nom commercial de LUTATHERA® par le laboratoire AAA (Advanced Accelerator Applications) filiale de Novartis depuis 2017. La TEP DOTA-TOC (SOMAKIT-TOC®) est aujourd'hui l'examen le plus sensible pour détecter les tumeurs neuroendocrines bien différenciées car il détecte les récepteurs à la somatostatine (SSTR), fortement exprimées par les TNE et s'y fixe de manière spécifique. Le ^{68}Ga -DOTA-TOC est un radiopharmaceutique obtenu par radio marquage au ^{68}Ga d'un analogue de la somatostatine : le DOTA-TOC (ou édotrétotide) pour l'imagerie spécifique des cellules exprimant les SSTRs (récepteurs à la somatostatine).

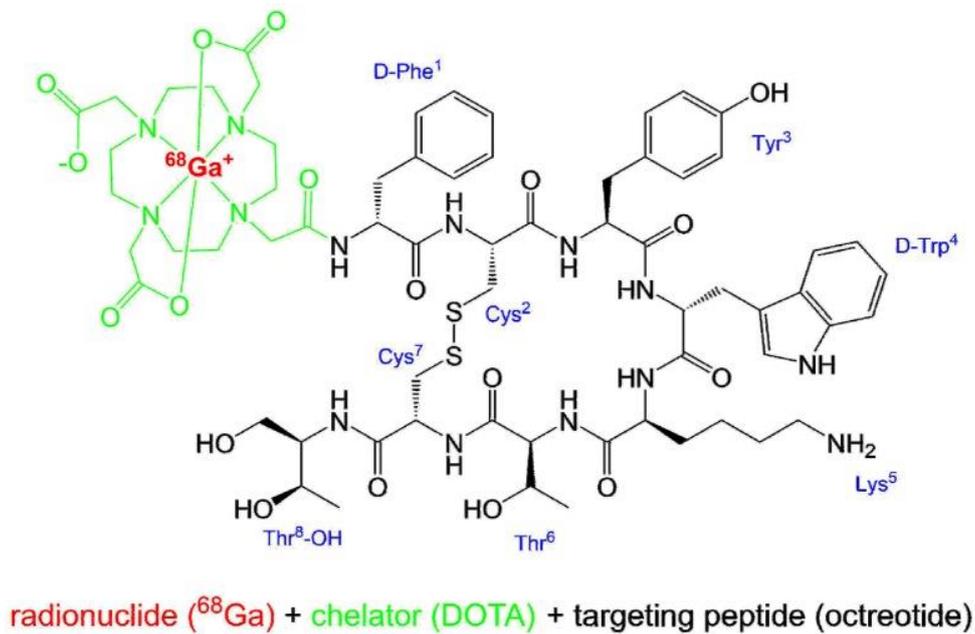


Figure 31: Structure du ^{68}Ga -DOTA-TOC⁶⁹.

Les médicaments radiopharmaceutiques TEP sont injectés par voie intraveineuse au patient qui bénéficie de cette imagerie. Le radionucléide se désintègre avec émission de positon. Selon la nature du tissu à cibler et la portée du radionucléide, le positon interagit avec un électron et une annihilation se produit entre les deux créant deux photons d'annihilations d'une énergie équivalente de 511Kev chacun dans une direction opposée d'un angle de 180°. La caméra TEP est équipée de détecteurs qui captent ces évènements en un intervalle de temps court (quelques nanosecondes). En dépit de sa faible résolution, cette modalité est idéale pour suivre et quantifier les évènements moléculaires du fait de sa sensibilité de l'ordre du pico molaire, inégalée par les autres modalités d'imagerie corps entier⁶⁹.

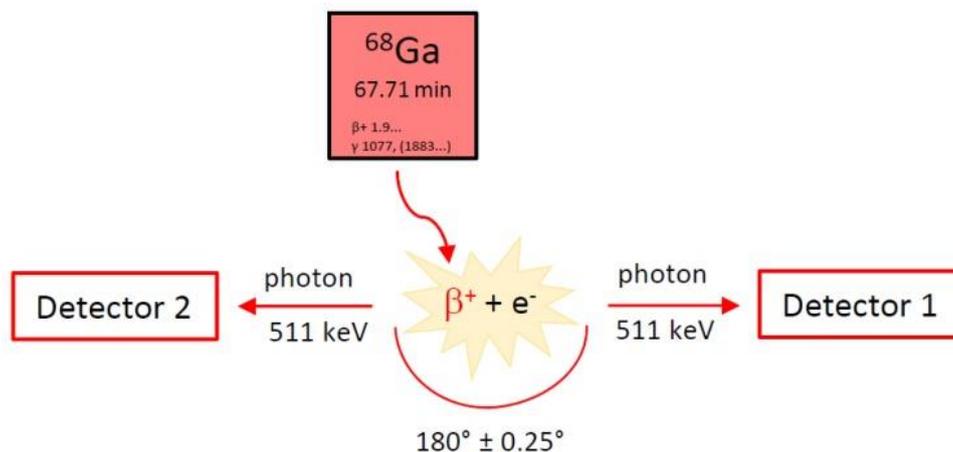


Figure 32 : Principe de la tomographie par émission de positrons (TEP)⁶⁹. β^+ : positrons ; e^- : électron.

La deuxième molécule faisant partie de ce couple théranostique est le ^{177}Lu -DOTA-TATE. Elle complète le ^{68}Ga -DOTA-TOC en ayant une application thérapeutique grâce aux rayonnements beta(-) émis par le lutetium-177. Les deux peptides montrent une forte affinité et une bonne sélectivité pour les récepteurs SSTR2⁶⁹.

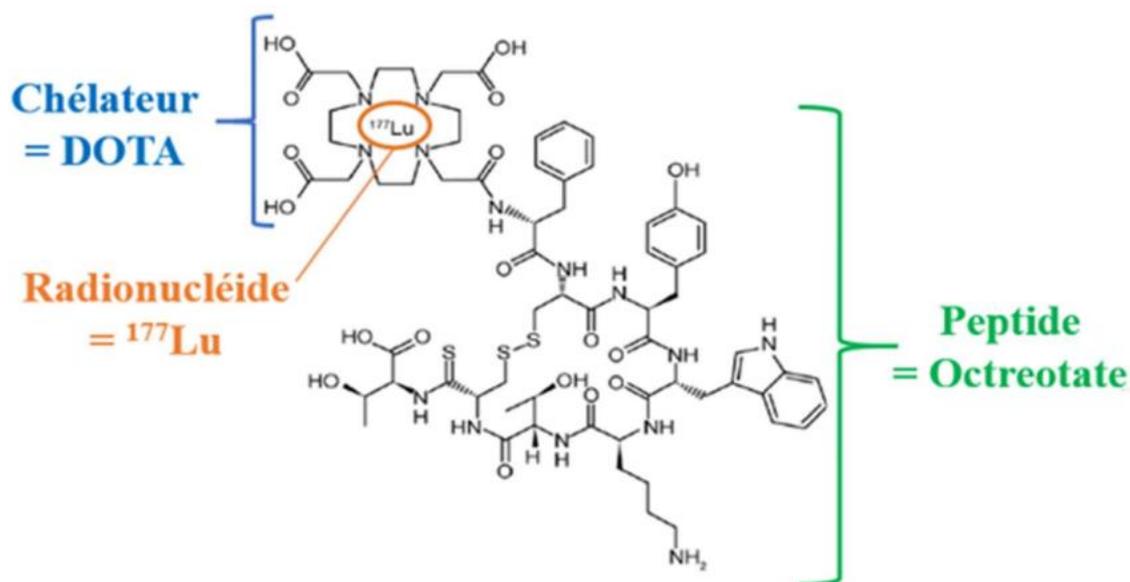


Figure 33 : Structure du ^{177}Lu -DOTA-TATE⁷⁰

Le ^{177}Lu -DOTA-TATE est donc composé du peptide de haute affinité pour les récepteurs à la somatostatine de type 2 : l'octréotate. Ce peptide est radiomarqué au lutétium 177 couplé à un chélateur : le DOTA $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CO}_2\text{H})_4$ ou tétraxétane.

Son mécanisme d'action est comparable au ^{68}Ga -DOTA-TOC. L'octreotide étant un analogue des récepteurs à la somatostatine, le ^{177}Lu -DOTA-TATE se fixe aux récepteurs SSTR2 surexprimés par les cellules tumorales puis est internalisé. Les rayonnements ionisants beta(-) émis entraînent prioritairement la destruction cellulaire des tissus ciblés.⁷⁰

Ce couple de radiotraceurs image bien le concept de théranostique de plus en plus recherché aujourd'hui pour l'impact qu'il représente dans la voie de la médecine de précision. Nous pouvons imaginer ce même concept dans le cas du sujet central de cette thèse, à savoir le développement d'une théranostique du cancer colorectal par ciblage du pseudo-récepteur tyrosine kinase PTK7, puisque ce traitement représente un large espoir.

IV. Radiothérapie interne vectorisée (RIV)

Une des pratiques qui s'inscrit dans le domaine de la théranostique se nomme la thérapie interne vectorisée. Il s'agit de l'administration par voie systémique d'un médicament radiopharmaceutique afin de libérer une dose d'irradiation à un point voulu ciblant la tumeur.

Cette technique s'utilise à des fins curatives ou palliatives.

Le médicament radiopharmaceutique est composé de la manière suivante :

- Une molécule jouant le rôle de vecteur, elle doit être spécifique de la cible (cela peut être un anticorps, un peptide etc...) qui est marqué par un radionucléide
- Un radionucléide, c'est-à-dire un isotope radioactif
- Un chélateur, qui permet de faire le lien entre le vecteur et le radionucléide

Les avantages de cette technique sont multiples car elle permet de délivrer une dose intense de radiations dans un petit volume de tissus, organes cible ou tumeur tout en diminuant l'effet toxique pour les tissus sains autour.

En clinique, plusieurs exemples de RIV peuvent-être citées :

^{177}Lu -DOTA-TATE (LUTATHERA®), dans le cadre des traitements des tumeurs neuroendocrines digestives, formant avec le ^{68}Ga -DOTA-TOC le seul couple théranostique à posséder une AMM en France à ce jour.

^{123}I / ^{131}I , pour la prise en charge diagnostique et thérapeutique des hyperthyroïdies résistantes à un blocage médicamenteux, utilisé depuis de nombreuses années.

^{177}Lu -PSMA, qui bénéficie de la part de l'ANSM d'une autorisation d'accès compassionnel (AAC) dans le cadre du traitement de récurrences de cancer de la prostate. Ce radionucléide est composé de PSMA, un antigène membranaire spécifique de la prostate, radiomarqué au lutétium-177.

De nombreux essais cliniques sont en cours et certains sont prometteurs pour l'avenir de la RIV et la prise en charge des patients.

V. Applications des techniques d'imagerie diagnostiques aux pseudo-récepteurs tyrosine kinase : cas de PTK7

A. Problématique

Afin que nos techniques soient recevables, il est nécessaire de développer un radiotracer ciblant PTK7, idéalement de la façon la plus sélective possible et avec la plus haute affinité possible. Idéalement, notre traceur TEP doit présenter des propriétés pharmacocinétiques telles qu'une absorption rapide par les tissus ciblés, une clairance rapide dans les autres tissus environnant, une bonne stabilité, et une faible immunogénicité en réponse de l'hôte. Toutes ces propriétés sont importantes afin que la fraction du radiotracer non liée à la cible tumorale soit éliminée rapidement. Il faut donc une pharmacocinétique adaptée à nos besoins précis le but étant que l'imagerie puisse être pratiquée rapidement après l'administration du radiotracer en minimisant la dose afin que celui-ci retourne chez lui en toute sécurité après la fin de l'examen.

Les molécules précédemment développées ne sont pas utilisables pour les raisons citées, leur poids moléculaire important, les doses élevées pour obtenir une activité et une pharmacocinétique encore peu connue.

B. Littérature

Un radiotracer a été développé par l'équipe de Jacobson et al ; en 2015⁷¹. Les chercheurs concernés ont développé un oligonucléotide ciblant PTK7 et pour lequel le marquage s'effectue avec le radionucléide F-18. Cet assemblage a été testé *in vitro* sur deux lignées cellulaires différentes qui sont les HCT116 et les U87MG. La première lignée est connue pour exprimer fortement ptk7 tandis que la seconde ne l'exprime que faiblement. Les résultats ont montré une forte affinité de ce radiotracer pour le pseudo-récepteur ptk7 avec une IC50 d'environ 2,7 nM pour la lignée HCT116 et de 16,9 nM pour la lignée U87MG. L'imagerie TEP *in vivo* a permis de visualiser l'expression de PTK7 chez les souris greffées avec les lignées cellulaires HCT116 et U87MG avec une différence d'absorption significativement cohérente avec la différence d'expression de PTK7 dans les deux lignées. La pharmacocinétique de ce traceur s'est montrée convenable puisque celui-ci a été rapidement éliminé du sang par les reins et la vessie. En conclusion, cette étude a prouvé la faisabilité et l'intérêt du développement d'un radiotracer ciblant PTK7.

C. Perspectives

Dans la continuité des résultats obtenus sur les molécules ciblant PTK7 au CRCM, il nous faut donc imaginer une autre manière de cibler PTK7 afin d'envisager de nouvelles perspectives en théranostique. Les petites molécules développées ne pouvant pas être utilisées pour le ciblage de PTK7 en l'état ; il faut envisager une alternative. Une possible nouvelle option serait le développement d'anticorps à domaine unique (SdAb).

1. Ciblage de PTK7

Le ciblage de PTK7 pourrait initialement s'effectuer à partir d'anticorps classique anti-PTK7 comme vu dans les précédents chapitres. Nous pourrions aussi envisager l'utilisation d'anticorps monoclonaux. En effet ils présentent un succès grandissant en cancérologie depuis quelques années. Néanmoins, plusieurs obstacles sont encore à franchir : une taille élevée entraînant une difficile pénétration dans certains tissus, et donc par extensions aux cellules tumorales ainsi que leur coût de production élevé⁷².

Cependant ce type de ciblage comporte un manque de spécificité et c'est pour cette raison que l'alternative d'un ciblage par un anticorps à domaine unique pourrait être envisagé.

Les Single-domain Antibody (SdAb) ou anticorps à domaines uniques sont des anticorps ne comportant pas les deux chaînes lourdes et les deux chaînes légères normalement présentes dans un anticorps classique. Ces anticorps ne disposent pas de chaînes légères contrairement à leurs analogues mais ne comportent que deux chaînes lourdes liées à des domaines variables.

Cette différence de structure rend ces anticorps plus petits, environ 95kDa contre 150kDa pour un anticorps classique. Les principaux avantages de leur utilisation sont :

- Petite taille : leur petite taille, moins de la moitié d'un anticorps classique, leur procure la possibilité de s'insérer au niveau d'épitopes difficiles d'accès et parfois « cachés » pour des anticorps classiques
- Stabilité : les anticorps à domaine uniques sont très stables et présentent une haute résistance aux solutions acides et aux températures élevées
- Soluble : ils présentent une grande solubilité du fait de leur fonction hydrophile accrue

Ces anticorps à domaine unique présentent également des propriétés de liaisons exceptionnelles. Leur grande affinité et leur spécificité de liaison nous font penser qu'ils sont de très bons outils candidats pour des essais biologiques et des applications cliniques.

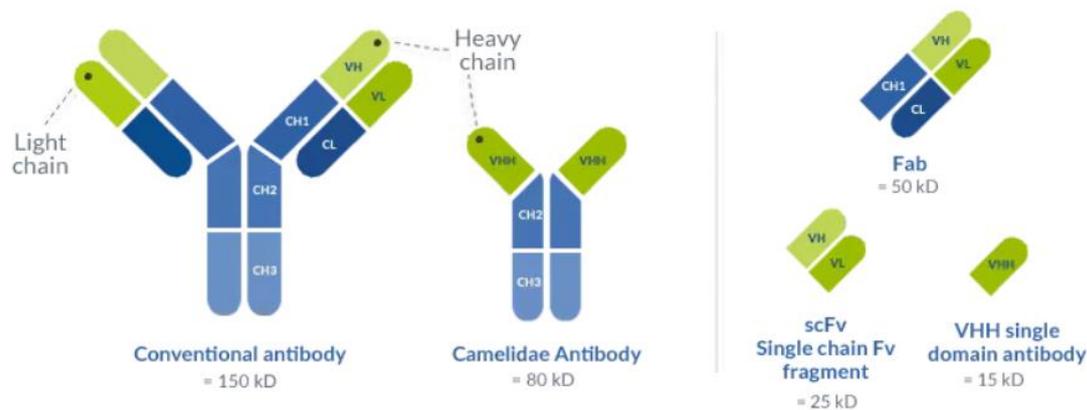


Figure 34 : Structure d'un anticorps conventionnel (à gauche) par rapport à un anticorps à domaine unique (à droite)⁷³.

2. Radiomarquage du SdAb

Classiquement, la radio marquage de molécules biologiques dépend des étapes suivantes⁷⁴ :

- Sélection d'un radionucléide : dans notre cas nous en choisissons deux, afin de pouvoir suivre le concept de théranostique développé plus haut. Il s'agit du couple $^{68}\text{Ga} / ^{177}\text{Lu}$. Le gallium sera donc dans une approche de diagnostic et d'imagerie tandis que le lutétium sera utilisé dans un but thérapeutique.

- La période physique : Cette caractéristique est très importante car il s'agit du temps au bout duquel l'activité du radionucléide a diminué de moitié. Cela signifie que cette durée doit être assez grande pour que notre ligand puisse atteindre la cible mais aussi assez court afin qu'il ne continue pas d'irradier le reste de l'organisme et les tissus sains. Dans le cas du gallium-68, la période physique est de 68 min, idéale pour l'imagerie TEP de radiotraceurs à base de peptides ou de petites molécules rapidement éliminées par voie rénale. Le lutetium-177 a une période physique de 6,7 jours : la spécificité de liaison et l'élimination rapide de la fraction non liée spécifiquement aux récepteurs tumoraux est donc cruciale pour permettre à la fois l'efficacité thérapeutique et une toxicité limitée.

Les radionucléides ont des modes de productions divers et variés comme l'utilisation de réacteurs nucléaire pour le lutetium-177, des générateurs pour le gallium-68 ou encore des cyclotrons pour le fluor-18⁷⁵.

3. Evaluation préclinique

En amont des essais cliniques, il est nécessaire qu'une approche préclinique soit imaginée pour notre molécule ciblant PTK7. Une étude préclinique nous permettrait d'acquérir les premières connaissances sur le comportement de notre SdAb radiomarké, ce qui est une étape indispensable avant de passer chez l'homme.

In vitro tout d'abord, une fois la radiosynthèse mise au point, il nous faudra vérifier la stabilité du radiomarkage en conditions physiologiques (mesures répétées de la pureté radiochimique après incubation dans du sérum) et vérifier également le maintien de son affinité et de sa spécificité pour sa cible (étude sur cellules et comptages). L'effet de la version thérapeutique du SdAb pourrait être évalué prioritairement sur cultures cellulaires de lignées tumorales et sur tumoroïdes.

La faisabilité, l'innocuité et l'efficacité de nos SdAb marqués avec le couple ⁶⁸Ga / ¹⁷⁷Lu pourraient être évalués chez des animaux atteints de cancers colorectal dont le diagnostic serait dépendant d'une forte expression de PTK7 et ne répondant de manière efficace à aucun autre traitement existant. Une fois le ligand idéal identifié et sous réserve d'obtention des autorisations de projet correspondantes de la part du Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche et de la part de l'Autorité de Sûreté Nucléaire, cette partie du projet pourrait être menée en collaboration avec le Centre Européen de Recherche en Imagerie Médicale (CERIMED) plateforme technologique et UMS Aix-Marseille Université – CNRS n°2012 (Pr B Guillet) qui rassemble sur le Campus Santé Timone toutes les infrastructures, ressources humaines et équipements nécessaires au développement de radiotraceurs innovants et à leur évaluation préclinique et clinique. Toutes les étapes de ce développement représentent autant de lignes à financer, dans le cadre d'une réponse à un ou plusieurs appel(s) à projet par exemple.

Cette expérimentation représenterait une source d'avancées majeures d'une part pour la nécessité de nouveaux traitements et d'autre part, par la connaissance de l'efficacité de l'utilisation de la thérapie interne vectorisée.

VI. Conclusion :

Le but de ce manuscrit était de définir l'intérêt du ciblage théranostique des pseudokinases.

Après avoir défini les pseudokinases, leurs caractéristiques et leurs intérêts en recherche dans un premier chapitre, nous avons choisi dans un second temps une liste de pseudokinases non exhaustives et démontré leur implication dans différentes pathologies. Il apparaît qu'elles ont une place importante en particulier dans la mise en place de processus cancéreux, avec l'exemple marquant du pseudo-récepteur tyrosine kinase PTK7 impliqué dans le cancer colorectal. Certaines molécules utilisées en soins courants sont déjà sur le marché mais la nécessité de nouvelles thérapies est à prendre en compte pour les patients résistants aux traitements déjà existant.

Par la suite, une étude menée au CRCM dans le cadre de mon externat dans l'équipe du Professeur Borg et supervisée par le docteur Laetitia Ganier, nous a permis de développer de petites molécules inhibitrices de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine par ciblage de l'interaction PTK7/ β -caténine. La conclusion de ce troisième chapitre se veut prometteuse pour l'avenir mais l'utilisation de ces petites molécules non possible chez l'homme en l'état, du fait de leur concentration trop importante. Elles représentent un espoir mais nécessitent des analyses complémentaires afin de comprendre leur fonctionnement exact et d'élucider leur mécanisme d'action.

Ces premières parties démontrent donc l'intérêt d'une nouvelle méthode de ciblage des pseudokinases.

Dans notre dernière partie, nous proposons l'association d'un anticorps à domaine unique à un marquage par deux radionucléides connus. L'utilisation d'un couple théranostique ciblant le pseudo-récepteur tyrosine kinase PTK7 par Tomographie par Emission de Positons (TEP) permet au couple théranostique d'associer d'une part : imagerie diagnostique et d'autre

thérapie, dans un contexte de thérapie interne vectorisée. En outre, nous proposons une voie de développement d'un anticorps à domaine unique, radiomarcqué par le couple de radionucléides $^{68}\text{Ga}/^{177}\text{Lu}$ pour cibler PTK7 et inhiber la voie de signalisation en aval. Cette méthode pourrait permettre de développer un nouveau traitement du cancer colorectal.

Elle pourrait également permettre le ciblage des pseudokinases trop souvent impliquées dans des processus tumoraux mais aussi dans le cadre d'autres pseudokinases impliquées dans d'autres pathologies, et pour lesquelles nous connaissons la valeur péjorative de leur surexpression.

VII. Bibliographie

1. Dissmeyer, N. & Schnittger, A. The age of protein kinases. *Methods Mol Biol* **779**, 7–52 (2011).
2. Knighton, D. R. *et al.* Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* **253**, 407–414 (1991).
3. Wu, P., Nielsen, T. E. & Clausen, M. H. FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. *Trends Pharmacol Sci* **36**, 422–439 (2015).
4. <https://www.aquaportail.com/definition-8716-kinase.html>.
5. Kung, J. E. & Jura, N. Prospects for pharmacological targeting of pseudokinases. *Nat Rev Drug Discov* **18**, 501–526 (2019).
6. Reiterer, V., Eysers, P. A. & Farhan, H. Day of the dead: pseudokinases and pseudophosphatases in physiology and disease. *Trends Cell Biol* **24**, 489–505 (2014).
7. Zeqiraj, E., Filippi, B. M., Deak, M., Alessi, D. R. & van Aalten, D. M. F. Structure of the LKB1-STRAD-MO25 complex reveals an allosteric mechanism of kinase activation. *Science* **326**, 1707–1711 (2009).
8. Zhang, N., Chang, Y., Rios, A. & An, Z. HER3/ErbB3, an emerging cancer therapeutic target. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **48**, 39–48 (2016).
9. Horinouchi, H. The prospect of patritumab for treating non-small cell lung cancer. *Expert Opin Biol Ther* **16**, 1549–1555 (2016).
10. Zhang, X., Gureasko, J., Shen, K., Cole, P. A. & Kuriyan, J. An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell* **125**, 1137–1149 (2006).
11. Hart *et al.* HER2 splice variants in breast cancer: investigating their impact on diagnosis and treatment outcomes.

12. Gil, V. *et al.* HER3 Is an Actionable Target in Advanced Prostate Cancer. *Cancer Res* **81**, 6207–6218 (2021).
13. Bièche, I. *et al.* Prognostic value of ERBB family mRNA expression in breast carcinomas. *Int J Cancer* **106**, 758–765 (2003).
14. Tanner, B. *et al.* ErbB-3 predicts survival in ovarian cancer. *J Clin Oncol* **24**, 4317–4323 (2006).
15. Sheng, Q. *et al.* An activated ErbB3/NRG1 autocrine loop supports in vivo proliferation in ovarian cancer cells. *Cancer Cell* **17**, 298–310 (2010).
16. De Boeck, A. *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote colorectal cancer progression through paracrine neuregulin 1/HER3 signalling. *Gut* **62**, 550–560 (2013).
17. Kim, S. *et al.* A functional comparison between the HER2(high)/HER3 and the HER2(low)/HER3 dimers on heregulin- β 1-induced MMP-1 and MMP-9 expression in breast cancer cells. *Exp Mol Med* **44**, 473–482 (2012).
18. Göstring, L. *et al.* Cellular effects of HER3-specific affibody molecules. *PLoS One* **7**, e40023 (2012).
19. Kol, A. *et al.* HER3, serious partner in crime: therapeutic approaches and potential biomarkers for effect of HER3-targeting. *Pharmacol Ther* **143**, 1–11 (2014).
20. LoRusso, P. *et al.* Phase I study of U3-1287, a fully human anti-HER3 monoclonal antibody, in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* **19**, 3078–3087 (2013).
21. Freeman, D. J. *et al.* Abstract A182: U3–1287 (AMG 888), a fully human anti-HER3 mAb, demonstrates in vitro and in vivo efficacy in the FaDu model of human squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN). in *New Molecular Targets A182–A182* (American Association for Cancer Research, 2011). doi:10.1158/1535-7163.TARG-11-A182.

22. Odintsov, I. *et al.* The Anti-HER3 mAb Seribantumab Effectively Inhibits Growth of Patient-Derived and Isogenic Cell Line and Xenograft Models with Oncogenic NRG1 Fusions. *Clin Cancer Res* **27**, 3154–3166 (2021).
23. Masiakowski, P. & Carroll, R. D. A novel family of cell surface receptors with tyrosine kinase-like domain. *J Biol Chem* **267**, 26181–26190 (1992).
24. Reddy, U. R., Phatak, S. & Pleasure, D. Human neural tissues express a truncated Ror1 receptor tyrosine kinase, lacking both extracellular and transmembrane domains. *Oncogene* **13**, 1555–1559 (1996).
25. Balakrishnan, A. *et al.* Analysis of ROR1 Protein Expression in Human Cancer and Normal Tissues. *Clin Cancer Res* **23**, 3061–3071 (2017).
26. Cui, B. *et al.* Targeting ROR1 inhibits epithelial-mesenchymal transition and metastasis. *Cancer Res* **73**, 3649–3660 (2013).
27. Zhang, S. *et al.* Ovarian cancer stem cells express ROR1, which can be targeted for anti-cancer-stem-cell therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 17266–17271 (2014).
28. Jung, E.-H., Lee, H.-N., Han, G.-Y., Kim, M.-J. & Kim, C.-W. Targeting ROR1 inhibits the self-renewal and invasive ability of glioblastoma stem cells. *Cell Biochem Funct* **34**, 149–157 (2016).
29. Menck, K., Heinrichs, S., Baden, C. & Bleckmann, A. The WNT/ROR Pathway in Cancer: From Signaling to Therapeutic Intervention. *Cells* **10**, 142 (2021).
30. Ghaderi, A. *et al.* A ROR1 Small Molecule Inhibitor (KAN0441571C) Induced Significant Apoptosis of Mantle Cell Lymphoma (MCL) Cells. *Pharmaceutics* **14**, 2238 (2022).
31. Liu, X. *et al.* Novel ROR1 inhibitor ARI-1 suppresses the development of non-small cell lung cancer. *Cancer Lett* **458**, 76–85 (2019).

32. Wallstabe, L. *et al.* ROR1-CAR T cells are effective against lung and breast cancer in advanced microphysiologic 3D tumor models. *JCI Insight* **4**, 126345 (2019).
33. Fultang, N. *et al.* Strictinin, a novel ROR1-inhibitor, represses triple negative breast cancer survival and migration via modulation of PI3K/AKT/GSK3 β activity. *PLoS One* **14**, e0217789 (2019).
34. Roy, J. P., Halford, M. M. & Stacker, S. A. The biochemistry, signalling and disease relevance of RYK and other WNT-binding receptor tyrosine kinases. *Growth Factors* **36**, 15–40 (2018).
35. Janovská, P. & Bryja, V. Wnt signalling pathways in chronic lymphocytic leukaemia and B-cell lymphomas. *Br J Pharmacol* **174**, 4701–4715 (2017).
36. Anastas, J. N. *et al.* WNT5A enhances resistance of melanoma cells to targeted BRAF inhibitors. *J Clin Invest* **124**, 2877–2890 (2014).
37. Mutation BRAF dans le Melanome.
38. Tury, A., Tolentino, K. & Zou, Y. Altered expression of atypical PKC and Ryk in the spinal cord of a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Dev Neurobiol* **74**, 839–850 (2014).
39. Liu, Y. *et al.* Ryk-mediated Wnt repulsion regulates posterior-directed growth of corticospinal tract. *Nat Neurosci* **8**, 1151–1159 (2005).
40. Keeble, T. R. & Cooper, H. M. Ryk: a novel Wnt receptor regulating axon pathfinding. *Int J Biochem Cell Biol* **38**, 2011–2017 (2006).
41. Keeble, T. R. *et al.* The Wnt receptor Ryk is required for Wnt5a-mediated axon guidance on the contralateral side of the corpus callosum. *J Neurosci* **26**, 5840–5848 (2006).
42. Schmitt, A. M. *et al.* Wnt-Ryk signalling mediates medial-lateral retinotectal topographic mapping. *Nature* **439**, 31–37 (2006).

43. Karvonen, H., Perttilä, R., Niininen, W., Barker, H. & Ungureanu, D. Targeting Wnt signaling pseudokinases in hematological cancers. *Eur J Haematol* **101**, 457–465 (2018).
44. Povinelli, B. J. & Nemeth, M. J. Wnt5a regulates hematopoietic stem cell proliferation and repopulation through the Ryk receptor. *Stem Cells* **32**, 105–115 (2014).
45. Simoneaux, D. K. *et al.* The receptor tyrosine kinase-related gene (ryk) demonstrates lineage and stage-specific expression in hematopoietic cells. *J Immunol* **154**, 1157–1166 (1995).
46. Liu, Y. *et al.* Repulsive Wnt signaling inhibits axon regeneration after CNS injury. *J Neurosci* **28**, 8376–8382 (2008).
47. Halford, M. M. *et al.* A fully human inhibitory monoclonal antibody to the Wnt receptor RYK. *PLoS One* **8**, e75447 (2013).
48. Weitz, J. *et al.* Colorectal cancer. *Lancet* **365**, 153–165 (2005).
49. Berger, H. *et al.* PTK7 localization and protein stability is affected by canonical Wnt ligands. *J Cell Sci* **130**, 1890–1903 (2017).
50. Dekker, E., Tanis, P. J., Vleugels, J. L. A., Kasi, P. M. & Wallace, M. B. Colorectal cancer. *Lancet* **394**, 1467–1480 (2019).
51. Thanikachalam, K. & Khan, G. Colorectal Cancer and Nutrition. *Nutrients* **11**, (2019).
52. Kim, J. H. Chemotherapy for colorectal cancer in the elderly. *World J Gastroenterol* **21**, 5158–5166 (2015).
53. Pérez-Herrero, E. & Fernández-Medarde, A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *Eur J Pharm Biopharm* **93**, 52–79 (2015).
54. Mossie, K. *et al.* Colon carcinoma kinase-4 defines a new subclass of the receptor tyrosine kinase family. *Oncogene* **11**, 2179–2184 (1995).
55. Martinez, S. *et al.* The PTK7 and ROR2 Protein Receptors Interact in the Vertebrate WNT/Planar Cell Polarity (PCP) Pathway. *J Biol Chem* **290**, 30562–30572 (2015).

56. Lhoumeau, A.-C. *et al.* Overexpression of the Promigratory and Prometastatic PTK7 Receptor Is Associated with an Adverse Clinical Outcome in Colorectal Cancer. *PLoS One* **10**, e0123768 (2015).
57. Jung, J. W., Ji, A. R., Lee, J., Kim, U. J. & Lee, S. T. Organization of the human PTK7 gene encoding a receptor protein tyrosine kinase-like molecule and alternative splicing of its mRNA. *Biochim Biophys Acta* **1579**, 153–163 (2002).
58. Qu, Q. *et al.* Wnt7a regulates multiple steps of neurogenesis. *Mol Cell Biol* **33**, 2551–2559 (2013).
59. Duchartre, Y., Kim, Y.-M. & Kahn, M. The Wnt signaling pathway in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* **99**, 141–149 (2016).
60. Ganier, L., Morelli, X. & Borg, J.-P. [Role in oncology and targeting of the PTK7 tyrosine kinase receptor]. *Med Sci (Paris)* **36 Hors série n° 1**, 42–46 (2020).
61. Puppo, F. *et al.* Protein tyrosine kinase 7 has a conserved role in Wnt/ β -catenin canonical signalling. *EMBO Rep* **12**, 43–49 (2011).
62. Peradziryi, H., Tolwinski, N. S. & Borchers, A. The many roles of PTK7: a versatile regulator of cell-cell communication. *Arch Biochem Biophys* **524**, 71–76 (2012).
63. Damelin, M. *et al.* A PTK7-targeted antibody-drug conjugate reduces tumor-initiating cells and induces sustained tumor regressions. *Sci Transl Med* **9**, eaag2611 (2017).
64. Mishra, M., Tiwari, S. & Gomes, A. V. Protein purification and analysis: next generation Western blotting techniques. *Expert Rev Proteomics* **14**, 1037–1053 (2017).
65. Yu, J. *et al.* CDX2 inhibits the proliferation and tumor formation of colon cancer cells by suppressing Wnt/ β -catenin signaling via transactivation of GSK-3 β and Axin2 expression. *Cell Death Dis* **10**, 26 (2019).

66. He, L. *et al.* Wogonin induced G1 cell cycle arrest by regulating Wnt/ β -catenin signaling pathway and inactivating CDK8 in human colorectal cancer carcinoma cells. *Toxicology* **312**, 36–47 (2013).
67. Plateforme Théranostique.
68. Lameka, K., Farwell, M. D. & Ichise, M. Positron Emission Tomography. *Handb Clin Neurol* **135**, 209–227 (2016).
69. Hennrich, U. & Benešová, M. [^{68}Ga]Ga-DOTA-TOC: The First FDA-Approved ^{68}Ga -Radiopharmaceutical for PET Imaging. *Pharmaceuticals (Basel)* **13**, E38 (2020).
70. Charles Dupire, D. Radiothérapie interne vectorisée par ^{177}Lu -Dotatate des tumeurs neuroendocrines au CHU de Bordeaux : retour d'expérience et étude des débits de dose des patients.
71. Jacobson, O. *et al.* ^{18}F -Labeled Single-Stranded DNA Aptamer for PET Imaging of Protein Tyrosine Kinase-7 Expression. *J Nucl Med* **56**, 1780–1785 (2015).
72. Patrick Chames, Daniel Baty. Fragments d'anticorps à domaine unique Les dAb, l'avenir des anticorps monoclonaux ?
73. Proteogenix. PRODUCTION D'ANTICORPS À DOMAINE UNIQUE VHH.
74. Mitra Ahmadi. NOUVEAUX RADIOTRACEURS PEPTIDIQUES POUR L'IMAGERIE NUCLEAIRE Radiomarquage, évaluations physico-chimiques et pharmacologiques.
75. Jussing, E. *et al.* Clinically Applicable Cyclotron-Produced Gallium-68 Gives High-Yield Radiolabeling of DOTA-Based Tracers. *Biomolecules* **11**, 1118 (2021).

VIII. Résumé

Les pseudokinases sont des protéines kinases inactives, du fait de l'absence ou de l'inactivation de leur domaine catalytique. Ce phénomène apparaît généralement suite à une modification acquise de leur structure. On estime qu'elles représentent environ 10% du kinome humain, ce qui en fait un phénomène courant.

Cependant, malgré l'absence de leur pouvoir catalytique, il apparaît que 2/3 des pseudokinases sont impliquées dans de nombreuses pathologies, dont elles sont parfois à l'origine. Elles représentent donc un intérêt de taille pour la recherche.

Nous présentons dans une première partie, l'implication des pseudokinases dans certaines pathologies et l'intérêt de leur ciblage en général.

Dans une seconde partie, nous nous intéressons au pseudo récepteur protéine tyrosine kinase PTK7 et son implication dans le cancer colorectal dans le cadre du Master 2, effectué au sein de l'équipe « Polarité cellulaire, signalisation et cancer » du Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille.

Par la suite, nous étudions le développement de petites molécules ciblant la voie de signalisation WNT/ β -caténine en nous focalisant l'interaction PTK7/ β -caténine. Le blocage de la voie semble effectif, toutefois les doses utilisées dans notre étude sont trop importantes pour être administrées *in vivo* et de nouveaux essais seront nécessaires afin de mieux comprendre les mécanismes d'action de ces molécules.

Nous proposons, dans le quatrième et dernier chapitre, l'utilisation d'un couple théranostique ciblant le pseudo-récepteur tyrosine kinase PTK7 par Tomographie par Emission de Positons (TEP). Ce concept, relevant du domaine de la thérapie interne vectorisée (RIV), permet d'associer imagerie diagnostique et thérapie.

En outre, nous proposons le développement d'un anticorps à domaine unique ciblant PTK7, radiomarqué par le couple de radionucléides $^{68}\text{Ga}/^{177}\text{Lu}$. Cette méthode pourrait permettre de développer un nouveau traitement contre le cancer colorectal, par le ciblage de la pseudokinase PTK7, qui représenterait également un espoir dans toutes les autres pathologies impliquant un pseudo-récepteur tyrosine kinase.

Mots clés : Pseudokinase, cancer colorectal, PTK7, WNT/ β -caténine, ciblage, théranostique, radionucléides, $^{68}\text{Ga}/^{177}\text{Lu}$.